

**AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN**

Direktor: Professor Dr. M. Eder

**STEREOLOGISCH-MORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN DER REGENERIERENDEN RATTENLEBER NACH
HYDROXYHARNSTOFF-DAUERBEHANDLUNG**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Schmidkonz
aus
München
1979

1980

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

STEREOLOGISCH-MORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN DER REGENERIERENDEN RATTENLEBER NACH
HYDROXYHARNSTOFF-DAUERBEHANDLUNG



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Schmidkonz
aus
München
1979



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Max Eder

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 12.02.1980

Herrn Prof. Dr. H. Rabes danke ich für die Themenstellung und für seine Betreuung und Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Hübner bin ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H.K. Selbmann danke ich für seine Beratung bei der Anlage der statistischen Testverfahren.

Frau Fazekas, Frl. Wojtek, Frl. Münsterer, Frl. Kerler, Frau Döhle und Herrn Hampe danke ich für ihre Unterstützung.

Die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ra 101/20) durchgeführt.

ABKÜRZUNGEN

HU = Hydroxyharnstoff

Kontr. = Kontrollgruppe

p.H. = 14 Std. nach partieller Hepatektomie

p.H.+HU = Hydroxyharnstoffbehandlung von der 14.

bis zur 30. Std. nach partieller Hepatek-
tomie

P = Periportaler Bereich

V = Perivenöser Bereich

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Grundlagen der Morphometrie mit stereologischen Methoden	2
2.1. Stereologie und Morphometrie	2
2.2. Terminologie und Definitionen	3
2.3. Symbole	5
2.4. Grundgleichungen der Stereologie	7
2.4.1. Bestimmung der Volumendichte	7
2.4.2. Bestimmung der Oberflächendichte	8
2.4.3. Bestimmung der numerischen Dichte	9
2.4.4. Einfluß der Schnittdicke	13
2.5. Stichprobensammlung	17
2.6. Testsysteme	24
3. Material und Methoden	28
3.1. Tiere	28
3.2. Behandlungsgruppen	28
3.3. Hydroxyharnstoff	29
3.4. Entnahme und Verarbeitung des Lebergewebes	30
3.5. Berücksichtigung der Topologie des Leber- läppchens	31
3.6. Vergrößerungsstufen	32
3.7. Stichprobensammlung	33
3.8. Morphometrisches Modell der Leberzelle	34
3.9. Testsysteme	37
3.10. Bestimmung der Schnittdicke der Ultradünn- schnitte	41
3.11. Berechnung der stereologischen Parameter	43
3.11.1. Begriffsdefinitionen	43
3.11.2. Berechnung der Primärparameter	44
3.11.2.1. Zusammenfassung der Meßwerte	44
3.11.2.2. Anwendung der stereologischen Formeln	44
3.11.3. Berechnung der Sekundärparameter	51

3.12. Statistik	54
3.12.1. Problemstellung.....	54
3.12.2. Varianzanalytisches Modell	55
3.12.3. Signifikanzschranken	62
4. Ergebnisse	64
4.1. Morphologische Befunde	64
4.2. Morphometrische Ergebnisse	72
5. Diskussion	90
5.1. Kontrollgruppe	91
5.2. 14 Std. nach partieller Hepatektomie	95
5.3. Hydroxyharnstoff 14. bis 30. Std. nach par- tieller Hepatektomie	99
6. Zusammenfassung	110
7. Tabellarischer Anhang	113
8. Literaturverzeichnis	138

1. EINLEITUNG

Die Regeneration der Rattenleber nach partieller Hepatektomie vollzieht sich bei ungestörtem Ablauf in einem Wechselspiel von Hypertrophie und Hyperplasie (Bucher 1963, 1967; Altmann 1966, Becker and Lane 1965). Bei den vorliegenden Experimenten wurde der Übergang der Hepatozyten in die Hyperplasie durch eine Dauerinfusion der teilhepatektomierten Tiere mit Hydroxyharnstoff, einem selektiven DNS-Synthese-Hemmstoff, verhindert. Einen Hinweis auf das Weiterbestehen der hypertrophischen Komponente auch unter diesen Bedingungen liefert das Fortlaufen der RNS- und Proteinsynthese trotz fast vollständiger Hemmung der DNS-Synthese (Schwartz et al. 1965, Yarbrow et al. 1965, Hill and Gordon 1968). Dieser Zustand der Dissoziation der makromolekularen Synthesen wird als "unbalanced growth" bezeichnet (Cohen and Barner 1954, Rueckert and Mueller 1960). In der Literatur fehlen Angaben über die Auswirkungen einer protrahierten DNS-Synthesehemmung durch Hydroxyharnstoff auf die Morphologie der Leberzellen. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, mit Hilfe morphometrisch-stereologischer Methoden (Weibel and Elias 1967a, Weibel 1969, Elias, Henning and Schwartz 1971) auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene das Ausmaß der hypertrophischen Vorgänge und den Anteil der einzelnen Zellbestandteile hieran zu erfassen und zahlenmäßig festzulegen. Besonderes Augenmerk wurde auf die getrennte Auswertung der Leberparenchymzellen entsprechend ihrer Lage im Leberlobulus gelegt, um der Heterogenität der Hepatozyten (Novikoff 1959, Shank et al. 1959) und ihrer unterschiedlich raschen Reaktion auf den Reiz der partiellen Hepatektomie (Rabes 1976) Rechnung zu tragen.

2. GRUNDLAGEN DER MORPHOMETRIE MIT STEREOLOGISCHEN METHODEN

2.1. Stereologie und Morphometrie

Das Wort "Stereologie" ist ein Begriff, der im Jahre 1961 bei der Gründung der "Internationalen Gesellschaft für Stereologie" (Bach 1963) neu geprägt wurde. Von Elias (1976) wurde folgende Definition vorgeschlagen: "Stereology, sensu stricto, deals with a body of methods for the exploration of three-dimensional space, when only two-dimensional sections through solid bodies or their projections on a solid surface are available. Thus, stereology could also be called extrapolation from two- to three-dimensional space."

Stereologie ist nicht mit "Morphometrie", der rein quantitativen Erfassung von Strukturen, gleichzusetzen (Weibel and Elias 1967b, Elias, Hennig and Schwartz 1971). So stellt z.B. die Bestimmung der Flächenanteile verschiedener Strukturen auf histologischen Schnitten - ohne Berücksichtigung ihrer 3-dimensionalen Eigenschaften - bereits Morphometrie dar. Zur Extrapolation dieser 2-dimensionalen Information in den 3-dimensionalen Raum bedarf es hingegen stereologischer Methoden.

Es ist zu beachten, daß es sich bei der Morphometrie mit stereologischen Methoden nicht darum handelt, einzelne Strukturen, z.B. einen einzelnen Hepatozyten, mit größtmöglicher Genauigkeit zu beschreiben. Das Ziel ist vielmehr, aus einer begrenzten Anzahl 2-dimensionaler Bilder zuverlässige Aussagen über den durchschnittlichen Aufbau einer 3-dimensionalen Struktur, z.B. des ganzen Organs Leber, zu erhalten. Die Auswertung 2-dimensionaler Bilder liefert Schätzwerte für die wahren Verhältnisse im 3-dimensionalen Raum (Weibel and Elias 1967c), deren Zuverlässigkeit und Vertrauensintervalle mit Hilfe statistischer Verfahren überprüft werden können. Um bei der Entnahme des Untersuchungsmaterials einen repräsentativen Querschnitt des Gesamtmaterials zu er-

halten, müssen die allgemeinen Regeln der Statistik zur Entnahme von Stichproben beachtet werden. Ausführliche Übersichten über die theoretischen Grundlagen der Stereologie und ihre praktische Anwendung bei der Erforschung biologischer Objekte finden sich bei Weibel (1969), Elias, Hennig and Schwartz (1971), Weibel and Bolender (1973).

Im folgenden sollen die Terminologie und die grundlegenden Formeln der Stereologie, soweit sie in dieser Arbeit verwendet werden, sowie das Vorgehen bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials näher erläutert werden.

2.2. Terminologie und Definitionen

Zur Beschreibung von Strukturen im Raum haben sich folgende Parameter als besonders geeignet erwiesen:

- a) Bezugsvolumen: Als Bezugsvolumen dient ein sogenanntes "Einheitsvolumen", das im allgemeinen auf 1 cm^3 festgelegt wird. Dabei können je nach Fragestellung verschiedene Strukturen zum Bezugsvolumen werden, z.B. 1 cm^3 Lebergewebe, 1 cm^3 Cytoplasma.
- b) Volumendichte: Volumenanteil einer Struktur in einem bestimmten umgebenden Bezugsvolumen (z.B. Volumenanteil der Mitochondrien in dem Bezugsvolumen 1 cm^3 Cytoplasma).
- c) Oberflächendichte: Ausdehnung der Oberfläche einer Struktur in dem umgebenden Bezugsvolumen (z.B. Ausdehnung der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums in 1 cm^3 Cytoplasma).
- d) Numerische Dichte: Anzahl von Einzelelementen in einem Bezugsvolumen (z.B. Anzahl von Leberzellkernen in 1 cm^3 Lebergewebe).

Diese Grundgrößen stellen sich im 2-dimensionalen Schnitt folgendermaßen dar (Abb.1):

- a) Dem Bezugsvolumen entspricht die Bezugsfläche.
- b) Die Volumendichte einer Struktur wird repräsentiert durch den Flächenanteil, den diese Struktur an der Bezugsfläche einnimmt.

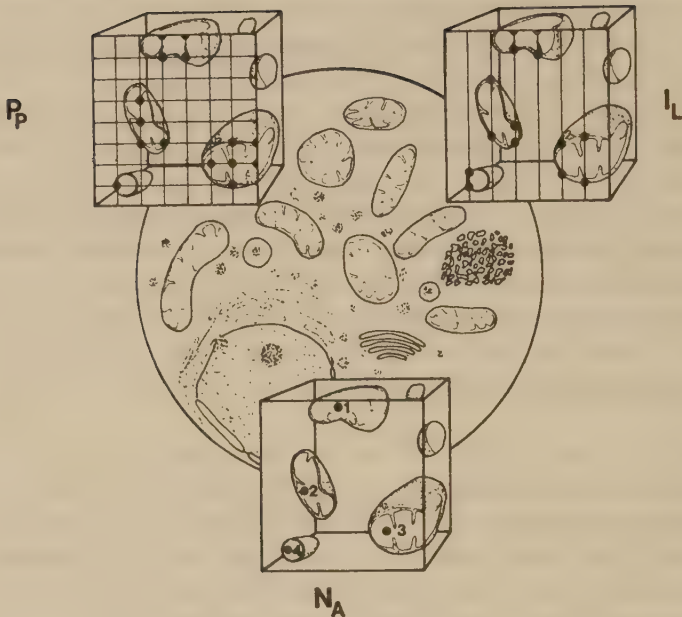


Abb. 1: Schematische Darstellung stereologischer Grundprinzipien zur Bestimmung der Volumen-, Oberflächen- und numerischen Dichte. P_P = Objektpunkte pro Gesamtzahl der Testpunkte, I_L = Schnittpunkte pro Testlinienlänge, N_A = Objektanschnitte pro Testfläche. Nähere Erklärungen siehe Text.
(Nach: Reith, Barnard and Rohr 1976).

- c) Die Oberflächendichte dieser Struktur steht in Zusammenhang mit der Gesamtlänge der Begrenzungslinien ihrer Anschnitte innerhalb der Bezugsfläche. Ein Beispiel: Es ist bekannt, daß verzweigte Strukturen wie das glatte endoplasmatische Retikulum eine größere Oberfläche darbieten als etwa kugelige oder zylindrische Körper glei-

chen Inhalts (Zellkerne oder Mitochondrien). Dies läßt sich auf dem Schnittbild daran erkennen, daß die Außenmembran des glatten ER, die 2-dimensional als begrenzende Linie zahlreicher Vesikel erscheint, eine größere Gesamtlänge aufweist als die glatt verlaufende äußere Mitochondrienmembran.

- d) Die numerische Dichte von Einzelelementen steht in Beziehung mit der Anzahl der Objektschnitte in der Schnittfläche.

Ziel der Stereologie ist es nun, diese Zusammenhänge zwischen 3-dimensionalen Strukturen und ihren 2-dimensionalen Schnittbildern mit Hilfe mathematischer Formeln genauer zu beschreiben.

2.3. Symbole

Die Grundparameter der Stereologie stellen, wie eben gezeigt, im allgemeinen Verhältnswerte zweier Größen dar, z.B. Anzahl von Objekten pro Volumen Gewebe oder Anzahl von Objektschnitten pro Bezugsschnittfläche. Für die Symbolschreibweise wurde die Übereinkunft getroffen, diese Beziehung jeweils mit zwei Großbuchstaben näher zu kennzeichnen. So gibt der erste Buchstabe an, welche Eigenschaft einer Struktur bestimmt werden soll (z.B. V=Volumen, S=Oberfläche (Surface), N=Anzahl), der zweite Buchstabe gibt das Bezugssystem an (z.B. V=Bezugsvolumen, A=Bezugsfläche (Area)). So bedeutet bei obigem Beispiel:
 N_V =Anzahl von Objekten pro Bezugsvolumen (numerische Dichte)
 N_A =Anzahl von Objektschnitten pro Bezugsfläche

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Symbole gibt die Tabelle 1.

Symbol	Definition	Dimension
V	Volumen räumlicher Strukturen oder Testvolumen	cm^3
S	Oberfläche einer Struktur	cm^2
N	Anzahl Strukturen (Partikel)	cm^0
T	Schnittdicke	
A	Fläche eines Schnittes od. Profils	cm^2
P	Anzahl Testpunkte	cm^0
B	Länge der äußeren Kontur einer Struktur auf dem Schnittbild	cm
I	Schnittpunkte zwischen Testlinien und der Oberflächenkontur einer Struktur	cm^0
A_T	Testfläche	cm^2
L_T	Testlinie	cm
P_T	Gesamtheit der Testpunkte	cm^0
V_{Vi}	Volumendichte der Struktur i	cm^3/cm^3
S_{Vi}	Oberflächendichte der Struktur i	cm^2/cm^3
N_{Vi}	Numerische Dichte der Struktur i	cm^0/cm^3
A_A	Anschnittsfläche pro Testfläche	cm^2/cm^2
B_A	Oberflächenkontur pro Testfläche	cm/cm^2
N_A	Anzahl Objektanschnitte pro Testfläche	cm^0/cm^2
I_L	Anzahl Schnittpunkte pro Testlinienlänge	cm^0/cm
P_P	Punktdichte	cm^0

Tab. 1: Liste stereologischer Symbole
(Entnommen aus: Weibel and Bolender 1973)

2.4. Grundgleichungen der Stereologie

2.4.1. Bestimmung der Volumendichte

Der französische Geologe Delesse wies im Jahre 1847 nach, daß die Volumendichte verschiedener Gesteinskomponenten an Hand ihrer Flächenanteile an zufällig ausgewählten Gesteinsschliffen bestimmt werden kann. Es gilt:

$$V_{Vi} = A_{Ai} \quad (1)$$

V_{Vi} = Volumendichte der Struktur i

A_{Ai} = Flächendichte der Struktur i

(Eine mathematisch exakte Ableitung dieser von Delesse empirisch entwickelten Beziehung findet sich u.a. bei Exner (1976.) Mit Hilfe dieses sog. "Delesse-Prinzips" war die Bestimmung der Volumendichte einer Komponente reduziert worden auf die Messung ihres Flächenanteils im Schnittbild.

Für diese Aufgabe wurden im Laufe der Zeit verschiedene Verfahren entwickelt.

1) Seit langem bekannt sind die Planimetrie und die Methode des "Ausschneidens und Wiegens" (Hammar 1914), die hier beide nicht näher besprochen werden müssen.

2) Im Jahre 1898 wurde von Rosival gezeigt, daß die Bestimmung der Flächenanteile an Schnitten mit Hilfe von Testlinien erfolgen kann, die zufällig über den Schnitt gelegt werden. Gemessen wird der Anteil des Linienzugs L_i an der Gesamtlänge der Testlinie L_T , der innerhalb der interessierenden Objekte zu liegen kommt. Daraus ergibt sich:

$$\frac{L_i}{L_T} = L_{Li} = A_{Ai} \quad (2)$$

3) Eine weitere Vereinfachung dieses Verfahrens erfolgte 1933 durch Glagoleff mit dem Nachweis, daß die Bestimmung der Flächenanteile auch durch ein einfaches Punktzählver-

fahren erfolgen kann. Hierbei wird über die Schnittfläche ein Punktraster mit der Gesamtpunktzahl P_T gelegt und die Anzahl derjenigen Punkte P_i gezählt, die innerhalb der Struktur liegen.

$$\frac{P_i}{P_T} = P_{Pi} = A_{Ai} \quad (3)$$

Bei Zusammenfassung der Gleichungen (1)-(3) ergibt sich (s. Abb. 1):

$$V_{Vi} = A_{Ai} = L_{Li} = P_{Pi} \quad (4)$$

Bei einer manuellen Auswertung der Schnittflächen kann die Bestimmung der Flächeninhalte mit Hilfe des Punktzählverfahrens weitaus schneller erfolgen als mit dem linearen Integrationsverfahren nach Rosival, d.h. bei gleichem Zeitaufwand können mehr Schnittflächen untersucht werden. Diese Tatsache führt aus statistischen Gründen, die später noch genauer besprochen werden, zu einer Verringerung des Gesamtfehlers, der die geringere Genauigkeit des Punktzählverfahrens bei der Einzelauswertung bei weitem ausgleicht. Bei der Besprechung der Testsysteme für die Volumenbestimmung wird daher im folgenden nur noch auf das Punktzählverfahren Bezug genommen.

2.4.2. Bestimmung der Oberflächendichte

Wie oben besprochen, besteht ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Oberflächendichte 3-dimensionaler Körper (S_V) und der Gesamtlänge der Grenzlinie ihrer Anschnitte (B_A = Boundary line per Area). Saltykov (1946) entwickelte erstmals die Beziehung:

$$B_A = \frac{\pi}{4} S_V \quad (5)$$

Es läßt sich nun weiter zeigen, daß die Gesamtlänge der Grenzlinie (B_A) der Anzahl der Schnittpunkte (I), die diese Grenzlinie mit darübergelegten Testlinien der Gesamtlänge (L_T) bildet, direkt proportional ist.

$$B_A = \frac{\pi}{2} \cdot \frac{I}{L_T} = \frac{\pi}{2} \cdot I_L \quad (6)$$

Die Gleichungen (5) und (6) zusammen ergeben:

$$S_V = 2 \cdot \frac{I}{L_T} = 2 \cdot I_L \quad (7)$$

Diese letzte Beziehung wurde von mehreren Autoren auf unterschiedliche Weise und unabhängig voneinander entwickelt. (Tomkeieff (1945), Saltykov (1946), Smith and Guttman (1953), Hennig (1956a)). Anschauliche und relativ einfache Ableitungen dieser Gleichungen werden bei Weibel (1969) und Elias, Hennig and Schwartz (1971) wiedergegeben.

Es sollte betont werden, daß es sich bei den bisher genannten Gleichungen trotz ihrer Einfachheit nicht um Näherungen handelt, sondern daß sie mathematisch korrekt sind (Elias, Hennig and Schwartz 1971). Insbesondere gelten sie unabhängig von der Form der untersuchten Strukturen, gleichgültig, ob es sich um Körper mit konvexen oder konkaven Oberflächen handelt, oder ob sie einzeln oder in zusammenhängender Form vorliegen. Auch die Wahl der Testsysteme ist in weiten Grenzen variabel. Es gibt nur eine Bedingung: Zwischen dem untersuchten Material und dem Testsystem darf keine Interferenz auftreten, d.h. eine eventuell vorhandene Struktur des Untersuchungsmaterials (z.B. bei anisotropen Geweben wie Muskeln und Nerven) und die Struktur des Testsystems dürfen sich gegenseitig nicht beeinflussen, da sonst eine Verfälschung des Ergebnisses auftreten kann (Abb. 2). Eine ausführliche Behandlung dieses Problems findet sich bei Weibel (1969).

2.4.3. Bestimmung der numerischen Dichte

Für die Bestimmung der numerischen Dichte von Körpern (N_V) aus der Anzahl ihrer Anschnitte (N_A) lassen sich aus prinzipiellen theoretischen Gründen (Weibel 1969) keine direkten Beziehungen entwickeln. Alle Gleichungen zu diesem

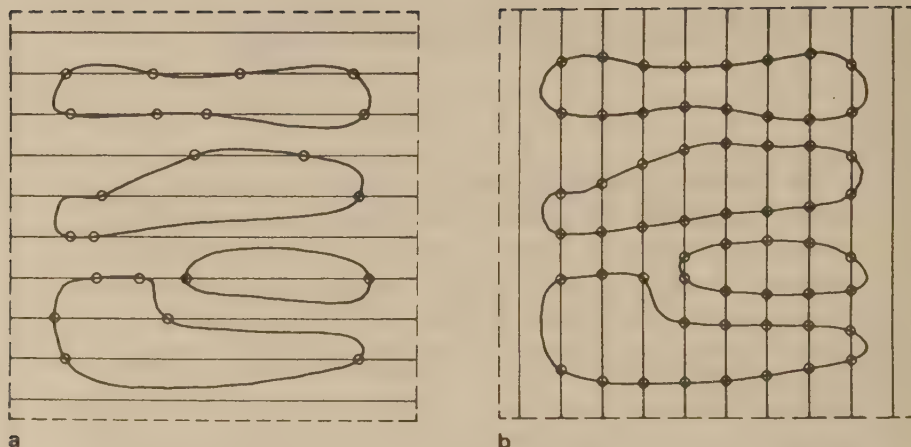


Abb. 2: Bestimmung der Schnittpunkte (I) zur Oberflächenmessung. Mögliche Interferenz zwischen Untersuchungsmaterial und Testsystem bei anisotropen Strukturen.

(Entnommen aus: Weibel and Bolender 1973)

Punkt sind abhängig von Angaben über Form und Größenverteilung der untersuchten Objekte, Bedingungen also, die bei der natürlichen Variabilität biologischer Strukturen nur näherungsweise zu erfüllen sind. Eine vergleichende Untersuchung verschiedener Methoden zur Bestimmung der numerischen Dichte wurde von Mayhew (1972) vorgenommen.

Eine von De Hoff and Rhines (1961) mathematisch exakt entwickelte Formel, die prinzipiell auf alle Körper anwendbar ist, lautet:

$$N_V = \frac{N_A}{\bar{D}} \quad (8)$$

wobei $\bar{D}$ gleich dem mittleren Partikeldurchmesser ist. Dieser mittlere Partikeldurchmesser ist jedoch in der Praxis an 2-dimensionalen Schnitten schwierig zu bestimmen, sobald die untersuchten Körper merklich von einer regelmäßigen Gestalt (z.B. Kugel oder Ellipse) abweichen oder sowohl hinsichtlich ihrer Form als auch ihrer individuellen Größe Schwankungen unterliegen (Elias, Hennig and Schwartz 1971; Weibel and Bolender 1973).

Die dabei auftretenden Schwierigkeiten sollen an Hand eines einfachen Beispiels verdeutlicht werden. Kugeln liefern auf dem 2-dimensionalen Anschnitt Kreise. Je nach Entfernung des Schnittes vom Kugelmittelpunkt werden größere oder kleinere Kreise entstehen. (Abb. 10) Solange die Kugeln von einheitlicher Größe sind, läßt sich der mittlere Durchmesser $\bar{D}$ durch einfaches Ausmessen der Anschnitte leicht bestimmen. Sobald jedoch Kugeln unterschiedlicher Größenklassen vorliegen, gilt es z.B. bei kleineren Anschnitten herauszufinden, welcher Anteil von ihnen zu mittelpunktsfernen Anschnitten größerer Kugeln oder aber zu mittelpunktsnahen Anschnitten von Kugeln mit geringerem Durchmesser gehört, um so am Ende einen wahren mittleren Durchmesser $\bar{D}$ berechnen zu können. Neben einigen recht komplexen mathematischen Ansätzen zur Lösung dieses Problems (z.B. Bach 1967; Übersicht bei Underwood 1968 und 1970) wurden auch einfachere graphische (Elias, Hennig and Schwartz 1971) und halbgraphische Methoden (Giger und Riedwyl 1970) vorgestellt.

Eine Formel zur Bestimmung der numerischen Dichte, die in der Anwendung einfacher, in ihrem Anwendungsbereich jedoch auch beschränkter ist, wurde von Weibel and Gomez (1962) und in erweiterter Form von Knight et al. (1963) angegeben:

$$N_V = \frac{K}{\pi} \cdot \frac{N_A^{3/2}}{V_V^{1/2}}$$

V_V = Volumendichte der Partikel

K = Faktor für die Größenverteilung

β = Formfaktor

Die Anwendung dieser Formel hat zur Voraussetzung, daß gewisse Aussagen über die Form der Partikel möglich sind. Zur Ermittlung des dimensionslosen Formfaktors β wurde von Weibel (1969) eine Graphik angegeben, in der sich der Faktor β für Rotationsellipsoide und Kreiszylinder bei Kenntnis ihrer Achsenverhältnisse ablesen läßt. Eine Reihe weiterer Formfaktoren, auch für andere Grundformen, finden sich bei Weibel and Bolender (1973).

Der Faktor K ist von der Größenverteilung der Partikel abhängig. Er besitzt den Wert $K=1$, wenn alle Partikel von gleicher Größe sind, und wird größer als 1, wenn Schwankungen um den Mittelwert auftreten. Insgesamt ist K jedoch von untergeordneter Bedeutung, da sein Wert bei einer so beträchtlichen Standardabweichung, wie z.B. von 25% des Mittelwertes, erst 1,07 beträgt. Im allgemeinen begnügt man sich daher mit einer relativ groben Schätzung von K , dessen Wert meist zwischen 1,01 und 1,10 liegen wird (Weibel 1969).

Beide Formeln zur Bestimmung der numerischen Dichte gelten nur unter bestimmten Bedingungen, von denen die beiden folgenden die wichtigsten sind (Weibel 1974):

- 1) Die untersuchten Partikel müssen konvex sein, d.h. sie dürfen bei allen möglichen Schnittrichtungen nur jeweils einen Anschnitt liefern.
- 2) Die Partikel müssen von weitgehend ähnlicher geometrischer Gestalt sein, während ihre individuelle Größe in bestimmten Grenzen schwanken darf.

Sind diese beiden Bedingungen nicht erfüllt, wie es z.B. im Rahmen dieser Untersuchung bei den Lebermitochondrien der Fall ist, dürfen die angegebenen Formeln strenggenommen nicht zur Anwendung kommen. Wird es dennoch versucht, müssen die so erhaltenen Ergebnisse mit großer Vorsicht interpretiert werden.

2.4.4. Einfluss der Schichtdicke

Alle dieser vorgestellten Grundgleichungen der Stereologie gelten zwar nur für den Idealfall einer unendlich dünnen Schichtdicke, der bei Gefäßesschnitten, die in aufeinander senkrecht stehenden Ebenen betrachtet werden, auch erfüllt ist. Histologische Schnitte, die in durchfallendem Licht betrachtet werden, stellen in Wirklichkeit "Mehrschichten" endlicher Schichtdicke dar. Das Bild dieser Schnitte entsteht durch eine Projektion aller in dieser "Mehrschicht" enthaltenen Strukturen auf die Oberfläche.

Aus diesem Grund kommt es bei der Bestimmung der Flächengehalt zu einem Überschuss zu einer Überrepräsentation der räumlichen (räumlichen) Strukturen zu Lasten der durchdringlichen Anteile (Abb. 3). Dieser sog. "Holmes Effekt" (Holmes 1922) führt zu größeren Fehlerabweichungen, sobald die Schichtdicke nicht mehr vernachlässigbar klein gegenüber dem Durchmesser der untersuchten Struktur ist. Eine Korrekturformel, die für unendliche Kugelige Körper gilt, wurde von Hennig (1956b) angegeben:

$$V_{Vo} = \frac{\frac{F_{Po}}{2}}{1 + \frac{2D}{\pi T}} \quad (10)$$

V_{Vo} = wahre korrigierte Volumendichte

F_{Po} = gemessene Punktdichte am Schnitt

D = Durchmesser der Struktur

T = Schichtdicke

Mit Hilfe dieser Formel läßt sich errechnen, daß z.B. bei einer Schichtdicke von 1/10 des Kugeldurchmessers die Volumendichte der untersuchten Kugeln um 13% zu hoch bestimmt wird und um diesen Wert nach unten korrigiert werden muß. Um den entsprechenden Wert muß dafür die Volumendichte des durchdringlichen Anteils daraufgesetzt werden.

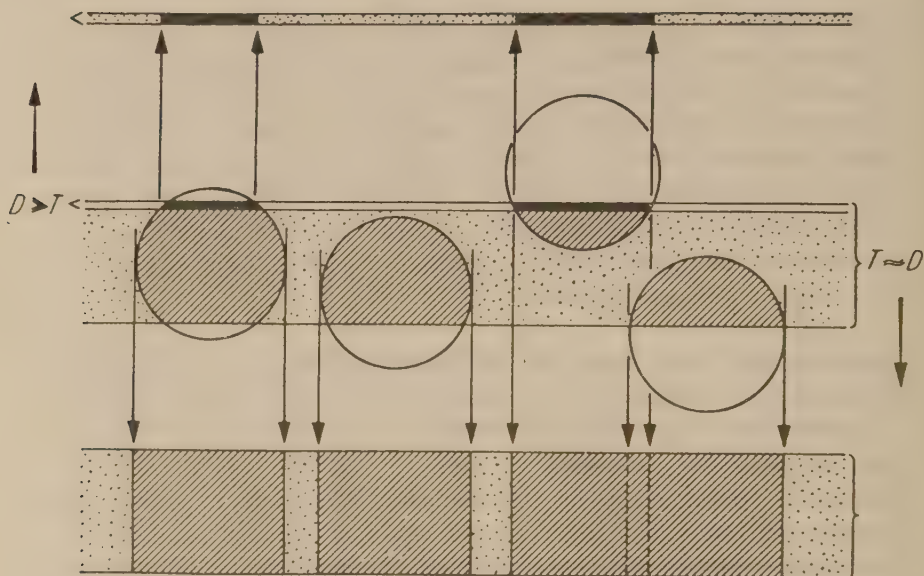


Abb. 3: Bei größerer Schnittdicke ($T \approx D$) ergibt sich im Vergleich zu dünnen Schnitten ($T \ll D$) eine Überschätzung undurchsichtiger (opaker) Strukturen durch Projektion des Schnittinhalts auf die Oberfläche ("Holmes-Effekt").

T =Schnittdicke, D =Partikeldurchmesser.

(Entnommen aus: Weibel and Elias 1967c)

Die Einflüsse der Schnittdicke auf die Bestimmung der Oberflächendichte sind schwieriger zu erfassen. Einerseits wurde ebenfalls von Hennig (1957a) gezeigt, daß die Oberflächendichte von kugeligen Zellkernen bei Schnittdicken in der Größenordnung des Kerndurchmessers um bis zu 92% des wahren Wertes überschätzt wird. In die gleiche Richtung

weist eine kürzlich von Weibel and Paumgartner (1978) vorgelegte Studie für den elektronenmikroskopischen Bereich. Anhand von Modellen, die Aufbau und Größe verschiedener Zellorganellen simulieren, errechneten sie für Leberzellen eine Überschätzung einiger Oberflächendichten in der Größenordnung von 20 - 40%.

Andererseits wurde von Loud (1967) darauf hingewiesen, daß auf dem Schnitt Membranen ab einem bestimmten Winkel zur Schnittebene nicht mehr als solche erkannt werden können. Loud schätzte für elektronenmikroskopische Aufnahmen den kritischen Winkel, ab dem die Identifizierung von Membranen nicht mehr möglich ist, auf 30° zur Schnittebene. Bei einer beliebigen Verteilung der Membranen im Raum ergibt sich im Durchschnitt ein Verlust von $1/3$ aller Membrananschnitte. Daraus errechnet sich ein Korrekturfaktor von 1,5, mit dem die ermittelte Oberflächendichte multipliziert werden müßte, um zu dem wahren Wert zu gelangen. Von Reith, Barnard and Rohr (1976) wurde jedoch anhand von Modellvorstellungen über das endoplasmatische Retikulum und über den inneren Aufbau von Mitochondrien berechnet, daß ein Korrekturfaktor dieser Größe so hohe Werte für die jeweilige Oberflächendichte ergibt, wie sie mit dem elektronenmikroskopischen Erscheinungsbild dieser Organellen kaum zu vereinbaren sind.

Angesichts der bestehenden Unsicherheiten über Richtung und Größe eines eventuellen Korrekturfaktors werden in dieser Arbeit für die Oberflächendichte nur unkorrigierte Werte angegeben.

Aus ähnlichen Gründen wie bei der Bestimmung der Volumendichte liefert auch die unkorrigierte Bestimmung der numerischen Dichte von opaken Körpern zu hohe Werte. Zur Korrektur der Schnittdicke wurde von Abercrombie (1946) und Hennig (1957b) folgende Formel angegeben:

$$N_V = \frac{N_{AT}}{\bar{D} + T} \quad (12)$$

N_{AT} = Zahl der Objektanschnitte (genauer: Projektionen) auf einem Schnitt der Fläche A und der Dicke T

$\bar{D}$ = mittlerer Objektdurchmesser

T = Schnittdicke

An Schnitten, die dicker als der Durchmesser der untersuchten Strukturen sind, wie dies z.B. bei Ribosomen in Ultradünnschnitten sicher der Fall ist, können sog. "Kappenanschnitte" oftmals nicht mehr gezählt werden. Dies rührt daher, daß diese mittelpunktsfernen Anschnitte neben einem kleinen Querdurchmesser nur eine geringe Tiefe in Blickrichtung aufweisen (s. Abb. 10). Das Erkennen von Strukturen in histologischen Schnitten beruht unter anderem auf ihrer unterschiedlichen Anfärbung und damit ihrem Kontrast gegenüber der Umgebung (Haug 1967). Da bei Partikeln zu geringer Tiefe mangels Masse eine ausreichende Anfärbung nicht mehr möglich ist, werden Identifizierungsschwierigkeiten das Erfassen kleiner Strukturen unterhalb einer bestimmten Grenze verhindern. Die Anwendung der Formel (12) führt deshalb leicht zu Unterkorrekturen, da die Erfassung aller theoretisch vorhandenen Objektanschnitte N_{AT} aus den genannten Gründen oftmals nicht vollständig sein wird.

Für kugelige Körper, bei denen eine Aussage über die Mindesttiefe k von gerade noch erkennbaren Kappenanschnitten möglich ist, kann eine von Haug (1967) angegebene, erweiterte Formel verwendet werden:

$$N_V = \frac{N_{AT}}{\bar{D} + T - 2k} \quad (13)$$

In diesem Zusammenhang soll nochmals auf die Bestimmung der Volumendichte eingegangen werden. Das Nichterkennen zu kleiner Anschnitte liefert auch bei der Bestimmung der Flächenanteile zu kleine Werte, die der Überschätzung durch den

"Holmes-Effekt" entgegenwirken. Aus diesem Grund wird es von Weibel (1969) für ausreichend erachtet, nur bei Schnittdicken, die größer als $1/10$ des Strukturdurchmessers $\bar{D}$ sind, eine Volumenkorrektur vorzunehmen.

Zum Abschluß sei noch erwähnt, daß von Elias, Hennig und Schwartz (1971) darauf hingewiesen wurde, daß nur wenige biologische Strukturen die nötige Undurchsichtigkeit aufweisen, um die volle Korrektur des "Holmes-Effektes" zu erfordern.

2.5. Stichprobensammlung

Wie eingangs bereits erwähnt, steht bei der Morphometrie mit stereologischen Methoden nicht eine Einzelstruktur im Mittelpunkt der Betrachtung, sondern das Ziel ist die Aussage über den Durchschnittswert all dieser Einzelstrukturen. In der Praxis soll nun diese Aussage an Hand einer begrenzten Anzahl von Untersuchungen erfolgen. Damit stellen sich zwei Fragen: 1) Welches ist die beste Methode, eine repräsentative Anzahl von Stichproben zu gewinnen. 2) Wie groß sind die Auswirkungen des statistischen Fehlers der zwangsläufig beim Rückschluß von Ergebnissen aus Stichprobenmaterial auf die wahren Werte der Gesamtheit auftritt. Zunächst möchte ich in Anlehnung an Weibel, Kistler and Scherle (1966) Art und Entstehung des statistischen Fehlers am Beispiel der hier vorliegenden Untersuchung von Lebergewebe näher erläutern.

Zur Reduktion des Untersuchungsmaterials auf die endgültige Zahl von Stichproben bedient man sich im allgemeinen, so wie auch hier geschehen, eines mehrstufigen Verfahrens.

1. Stufe: Von der gesamten Leber wird nur eine gewisse Zahl von Gewebestücken zur Untersuchung herangezogen.
2. Stufe: Von jedem einzelnen Block werden nur ein Schnitt und von diesem nur einige aller theoretisch möglichen Gesichtsfelder ausgewertet.

3. Stufe: Diese letzte Stufe besteht darin, daß jedes Gesichtsfeld nur mit einer gewissen Genauigkeit ausgewertet wird; am Beispiel der Volumenbestimmung von Zellstrukturen mit Hilfe des Punktrasters bedeutet dies, daß genau genommen nur diejenigen Stellen des Gesichtsfeldes ausgewertet werden, die von einem Punkt getroffen werden, während die restliche Fläche der Bewertung entzogen wird.

Auf jeder Stufe findet somit eine Stichprobenentnahme aus dem Material der vorhergehenden Stufe statt. Dabei entsteht jeweils ein Fehler, der in den ersten beiden Stufen bedingt ist durch die natürliche Variabilität biologischer Objekte und in der dritten Stufe abhängig ist von der Meßgenauigkeit des verwendeten Testsystems. Diese drei Teilfehler werden zahlenmäßig dargestellt durch die Varianzen einer jeden Stufe (S_1^2 , S_2^2 und S_3^2), die sich zu einem Gesamtfehler ($V(\bar{y})$) addieren. Wie man an Hand der Formel (14) sehen kann, ist eine Verringerung dieses Gesamtfehlers nur durch eine Erhöhung der Stichprobenumfänge (n) einzelner Stufen möglich. Dabei soll n_1 auf der ersten Stufe die Anzahl der Gewebeblocke darstellen, n_2 die Anzahl der Gesichtsfelder pro Block, und n_3 (bei dem Beispiel der Bestimmung der Volumendichte mit Hilfe eines Punktrasters) die Anzahl der Punkte pro Gesichtsfeld.

$$V(\bar{y}) = \frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_1 \cdot n_2} + \frac{S_3^2}{n_1 \cdot n_2 \cdot n_3} \quad (14)$$

$V(\bar{y})$ = Gesamtfehler

S_1^2 , S_2^2 , S_3^2 = Varianzen der Sammelstufen 1 - 3

n_1 , n_2 , n_3 = Stichprobenumfänge der Sammelstufen 1 - 3

Wie man erkennen kann, ist der Einfluß der einzelnen Stufen auf den Gesamtfehler recht unterschiedlich. Eine Erhöhung der Punktezahl pro Gesichtsfeld (n_3), die eine genauere Auswertung des Einzelbildes ermöglicht, kann weit weniger zur Reduzierung des Gesamtfehlers beitragen als

eine Erhöhung der Zahl der Gewebeblocks (n_1). Es ist dabei besonders zu beachten, daß dieser Effekt auch dann auftritt, wenn bei einer Vermehrung der Gewebeblocks die Punktezahl pro Gesichtsfeld soweit verringert wird, daß das Produkt ($n_1 \cdot n_2 \cdot n_3$), also die Gesamtzahl aller ausgewerteten Punkte, konstant bleibt. Diese Tatsache wurde vor allem von Hennig (1957b, 1967, Hennig and Meyer-Arendt 1963) im Zusammenhang mit der Wahl der richtigen Testsysteme zur Auswertung der Einzelbilder betont. Er wies wiederholt darauf hin, daß es zur Reduzierung des statistischen Fehlers weitaus günstiger ist, bei gleichem Arbeitsaufwand mehr Gesichtsfelder mit geringerer Genauigkeit auszuwerten als weniger Bilder mit größerer Genauigkeit. Oder wie es von Sitte (1967) formuliert wurde: "Im übrigen gilt stets die Regel, daß es besser ist, 100 verschiedene Bilder je einmal auszuwerten, als ein Bild mit 100mal größerer Genauigkeit." Natürlich ist die Genauigkeit der Einzelmessung nicht unwichtig, sie sollte jedoch in einem vernünftigen Verhältnis zu den vorhergegangenen Sammelstufen stehen. Dieser Punkt wird später bei der Besprechung der einzelnen Testsysteme nochmals behandelt werden.

Einer beliebigen Ausweitung der Stichprobenanzahl in der ersten Stufe steht jedoch der finanzielle Aspekt entgegen (Weibel, Kistler and Scherle 1966), da bei gleichbleibender Gesamtpunktzahl eine Vermehrung der Gewebeblocks mit ihrer Weiterverarbeitung weit größere Kosten verursacht, als die Erhöhung der Punktezahl pro Gesichtsfeld in der letzten Stufe. Aus diesem Grund wird man je nach dem Ziel der Untersuchung unterschiedliche Ansprüche an die Genauigkeit der Methode erheben und nach geeigneten Kompromissen suchen. Dabei gilt wegen der Beziehung:

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S^2}{n}} \quad (15)$$

$s_{\bar{x}}$ = Standardfehler; S^2 = Varianz; n = Stichprobenumfang; daß es erst bei einer Vervielfachung des Stichprobenumfanges zu einer Halbierung des Standardfehlers kommt.

Als nächstes soll das Vorgehen bei der Stichprobengewinnung besprochen werden. Die bei Experimenten übliche Auswahl des Stichprobenmaterials durch Zufallszuteilung hat beim mehrstufigen Sammeln zur Folge, daß jeweils eine Zufallsreihe in der nächsten Stufe nochmals mit einem anderen Zufallsglied überzogen wird. Es ließ sich durch theoretische Überlegungen (Hennig 1967) und auch empirisch (Ebbesson and Tang, 1967; Briesse and Carpenter 1967) zeigen, daß bei einem bereits einmal randomisierten Material alle weiteren Unterschritte, wie sie beim mehrstufigen Sammeln nötig sind, vorteilhafter mit Hilfe des sogenannten "systematischen Stichprobensammelns" ("systematic random sampling", Weibel 1969) erfolgen. Die Stichprobenauswahl orientiert sich hierbei an einem von außen eingebrachten System, z.B. einem Gitternetz oder einem regelmäßigen Testsystem, das eine Stichprobensammlung in immer gleichbleibenden Schritten ermöglicht. Die Zufallszuteilung bleibt dennoch gewahrt, solange die Lage des Untersuchungsmaterials zum Netz oder Testsystem zufällig gewählt wird und das biologische Material nicht selbst eine Periodik aufweist, die mit dem Testsystem interferiert (s. Abb. 2). Es gelingt hier, den Stichprobenfehler niedriger zu halten, als es durch eine reine Zufallsauswahl möglich wäre.

In der Praxis wird dieses Verfahren vor allem in den Sammelstufen zwei und drei bei der Auswahl der Gesichtsfelder und bei der Konstruktion der Testsysteme zur Auswertung der Einzelbilder angewandt.

Ein einfaches Verfahren für die Elektronenmikroskopie, das jeden subjektiven Einfluß bei der Wahl der Aufnahmen verhindert und gleichzeitig die Vorteile des systematischen Stichprobensammelns bietet, wurde von Weibel, Kistler und Scherle (1966) vorgeschlagen. Sie empfehlen, als Referenzsystem die Maschen des die Ultradünnschnitte tragenden Kupfernetzes zu benutzen. Die Aufnahmen erfolgen in fortlaufender Reihenfolge in jeweils einer bestimmten Ecke der Kupfermaschen, solange bis die gewünschte Anzahl von Aufnahmen pro Schnitt erreicht ist (Abb. 4). Sind

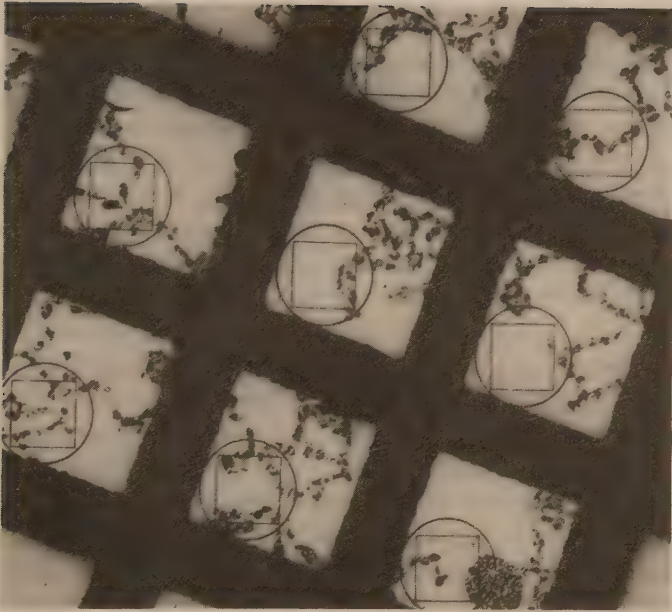


Abb. 4: Systematische Stichprobensammlung.

Als Bezugssystem für das "systematic random sampling" werden bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Maschen des die Ultradünnschnitte tragenden Kupfernetzes benutzt.

(Entnommen aus: Weibel, Kistler and Scherle 1966)

viele Aufnahmen an einem kleinen Schnitt erforderlich, ist es auch möglich, mehr als eine Ecke pro Masche zu benutzen. (Weibel and Bolender 1973; Hess, Weibel and Preisig 1973)

Für die Lichtmikroskopie wurde von Freere and Weibel (1967) und Gander (1967) ein motorgetriebener Präparatetisch beschrieben, der zu einer Verschiebung des histologischen

Schnittes ebenfalls in gleichbleibenden Abständen führt.

Für die Auswahl der Gewebeblocke im ersten Sammelschritt begnügt man sich wegen der technischen Schwierigkeiten, die hier bei der Durchführung des systematischen Stichprobensammelns auftreten würden, im allgemeinen mit einer reinen Zufallsauswahl. Die Gefahr subjektiver Einflüsse ist bei der Wahl der Gewebeblocke auch geringer als bei den nachfolgenden Sammelstufen. Ein Verfahren für die Auswahl der Gewebeblocke mit Hilfe von Zufallszahlen wurde von Weibel (1963 a) angegeben.

Über den Umfang der einzelnen Sammelstufen lassen sich wegen der Vielzahl der biologischen Strukturen und ihrer ungleichen Verteilung im Gewebe keine allgemeinverbindlichen Regeln aufstellen (Weibel and Bolender 1973). Wie zuvor bereits ausgeführt, ist der jeweilige Umfang auch von den Ansprüchen an die Genauigkeit der Ergebnisse und damit von dem Ziel der Untersuchung abhängig. Ein Maß für die Genauigkeit liefern bei normal verteilten Werten die sog. "Vertrauensintervalle":

$$\text{Vertrauensintervall} = \bar{x} \pm t \cdot s_{\bar{x}} \quad (16)$$

$\bar{x}$ = gemessener Mittelwert

$s_{\bar{x}}$ = Standardfehler

t = Faktor der Student-Verteilung, dessen Werte für vorgegebene Freiheitsgrade ($n-1$) und für die gewünschten Vertrauensintervalle in entsprechenden Tabellen aufgeführt sind (z.B. Sachs 1972).

Das üblicherweise angegebene 95%-Vertrauensintervall besagt, daß der wahre Wert mit 95%iger Wahrscheinlichkeit innerhalb der so berechneten Grenzen um den gemessenen Mittelwert liegen wird. Je kleiner der Standardfehler und damit je kleiner der Streubereich für das Vertrauensintervall ist, desto exakter ist die Aussage der vorliegenden Untersuchung. Dabei wird von manchen Untersuchern für bio-

logische Messungen eine maximale Breite des 95%-Vertrauensintervalls von 10% des Mittelwertes angestrebt (Weibel 1963a). Wie von Weibel (1969) weiter ausgeführt wurde, läßt sich wegen der Beziehung zwischen Standardfehler und Stichprobenzahl n (Gleichung 15) bei einer Erweiterung der Breite des 95%-Vertrauensintervalls von 10% auf 15% des Mittelwertes die nötige Zahl der Beobachtungen um die Hälfte reduzieren. Dies gilt wegen der Abhängigkeit der Größe t von den Freiheitsgraden ($n-1$) und damit von n , jedoch nur für nicht zu kleine Stichproben.

Ein gewisser Nachteil ist, daß die Vertrauensintervalle erst nach Abschluß der Messungen bestimmt werden können. Methoden, die bereits vor Beginn einer Untersuchung Aussagen über den notwendigen Stichprobenumfang erlauben, sind in einfacher Form bisher nur für die Bestimmung der Volumendichte entwickelt worden (Weibel 1963a). Jedoch auch in diesem Fall erfolgt nur eine Angabe des nötigen Gesamtumfangs pro Untersuchung, die keinen Aufschluß über die einzuhaltenden Mindestgrößen der einzelnen Sammelstufen gibt.

Bei den Angaben über das experimentelle Vorgehen bei morphometrischen Untersuchungen, die bisher in der Literatur veröffentlicht wurden, handelt es sich daher vorwiegend um empirische Daten. Als Beispiele seien die Werte dreier Arbeitsgruppen für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Rattenleber genannt: Sie schwanken zwischen 3 Gewebeblöcken pro Leber mit 6 Aufnahmen pro Block (Rohr und Riede 1973; Rohr et al. 1976), 3 bzw. 5 Blöcken zu je 3 Aufnahmen (Loud 1968; Wiener et al. 1968), und 5 Blöcken zu je 5 bis 7 Aufnahmen (Weibel et al. 1969; Stäubli et al. 1969; Bolender and Weibel 1973). Ausführlichere Angaben zur Berechnung der Stichprobenfehler bei den verschiedenen stereologischen Untersuchungsmethoden finden sich bei Hilliard (1976).

2.6. Testsysteme

Die Testsysteme zur Auswertung der einzelnen Gesichtsfelder oder Aufnahmen sind das letzte Glied in der Folge des systematischen Stichprobensammelns. Da sich die besprochene Überlegenheit des systematischen Vorgehens auch auf die Testsysteme anwenden läßt (mit denselben Einschränkungen bezüglich anisotroper Strukturen), werden im allgemeinen nur noch regelmäßig aufgebaute Testsysteme verwendet.

Die u.a. von Chalkley (1949), Haug (1955) und Hennig (1957b) vorgeschlagenen Testsysteme wurden von Weibel, Kistler und Scherle (1966) dahingehend weiterentwickelt, daß sie die Bestimmung der drei stereologischen Grundparameter in einem einzigen System gestatten, und zwar (Abb. 1):

- a) für die Volumendichte, die Zählung der in den Strukturanschnitten i eingeschlossenen Punkte (P_i) pro Gesamtpunktzahl (P_T)
- b) für die Oberflächendichte, die Zählung der Schnittpunkte der Membranen (I_i) mit Testlinien der Gesamtlänge (L_T)
- c) für die numerische Dichte, die Zählung der Objektschnitte (N_i) pro Testfläche (A_T).

Systeme, bei denen die Testfläche A_T , die Testlinienlänge L_T und die Gesamtpunktzahl P_T in einem zahlenmäßigen Verhältnis zueinander stehen, werden von Weibel "kohärente Testsysteme" (Weibel, Kistler and Scherle 1966) genannt.

Das einfachste System, das diese Forderung erfüllt, ist ein Quadratrastersystem (Abb. 5a,b). Die Schnittpunkte der Gitterlinien miteinander dienen hierbei als Punkte für die Volumenbestimmung, die Gitterlinien als Testlinien und der Rahmen des Quadratrasters umgrenzt die Testfläche. Dabei gilt bei einem Gitterabstand d :

Testpunkte: P_T

Testlinienlänge: $L_T = P_T : 2d$

Testfläche: $A_T = P_T : d^2$

In Abb. 5a gehört die gestrichelte Linie nicht zu den Test-

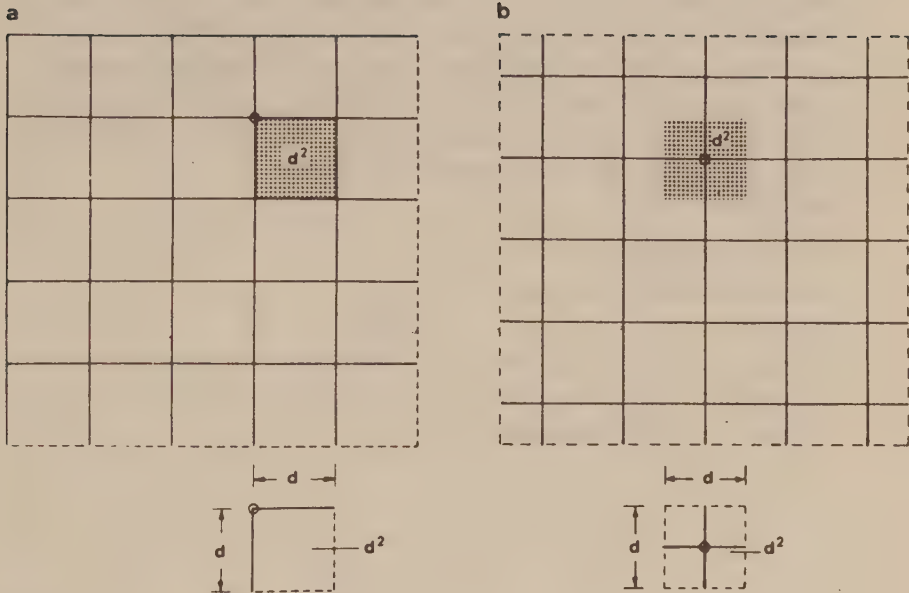


Abb. 5: Quadratrastersystem. Beispiel eines "kohärenten" Testsystems (Weibel, Kistler und Scherle 1966) zur Bestimmung der Volumen-, Oberflächen- und numerischen Dichte mit Hilfe eines einzigen Testsystems. Die Varianten a und b sind hierbei identisch.
(Nach: Weibel und Bolender 1973)

linien und liefert auch keine Testpunkte. Das gleiche Testsystem kann daher auch in etwas anderer Form gezeichnet werden (Abb. 5b).

Das Quadratraster liefert für die Oberflächenbestimmung eine unnötig hohe Anzahl von Schnittpunkten, da jedes ge-

schlossene Profil, das einen Testpunkt enthält, zwangsläufig 4 Schnittpunkte mit den Gitterlinien liefert. Aus diesem Grund wurde von Weibel, Kistler und Scherle (1966) nach dem System von Chalkley (1949) das "Mehrzweckraster" ("Multipurpose test system") entwickelt, das ebenfalls ein kohärentes Testsystem darstellt (Abb. 6). Für dieses System gilt bei einer Länge z der kurzen Linien:

Testpunkte: P_T

Testlinienlänge: $L_T = P_T \cdot \frac{1}{2}z$

Testfläche: $A_T = P_T \cdot \frac{3}{2} z^2$

Weitere Einzelheiten über diese Testsysteme und Abwandlungen für anisotrope Strukturen sind bei Weibel and Bolender (1973) ausgeführt.

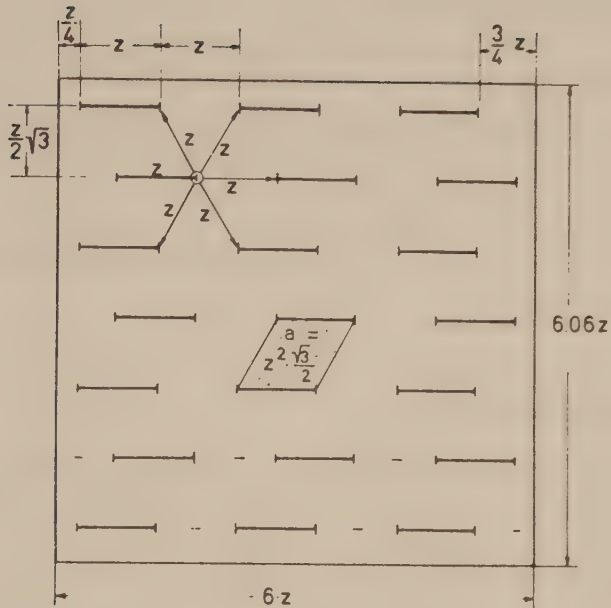


Abb. 6: Mehrzweckraster ("Multi-purpose-Raster")
(Entnommen aus: Weibel and Bolender 1973)

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Tiere

Für die vorliegende Versuchsserie wurden insgesamt 12 männliche Wistarratten vom Stamm AF/Hann, mit einem Durchschnittsalter von 50 Tagen und einem Durchschnittsgewicht von 210 g (202-220 g) verwendet. Die Tiere erhielten eine Altromin-R Standarddiät (Altromin, Lippe, Lage) und Wasser ad libitum.

3.2. Behandlungsgruppen

Es wurden drei Versuchsgruppen zu je 4 Tieren gebildet:

- a) Die Tiere der ersten Gruppe blieben unbehandelt und dienten als Kontrollgruppe. (Abkürzung: Kontr.)
- b) Die Tiere der zweiten Gruppe wurden in Äthernarkose in üblicher Weise 2/3-teilhепatektomiert (Higgins und Anderson 1931) und 14 Std. nach der Operation getötet. (Abkürzung: p.H. = partielle Hepatektomie).
- c) Die Tiere der dritten Gruppe wurden nach der Teilhepatektomie von der 14. Std. bis zum Tötungszeitpunkt in der 30. Std. nach Operation mit Hydroxyharnstoff (HU) behandelt. Sie erhielten in der 14. Std. eine intravenöse Einzelinjektion HU (purissimum, Serva, Heidelberg), gelöst in 0,15 M NaCl, in einer Dosierung von 1,69 mmol HU/kg Körpergewicht, gefolgt von einer Dauerinfusion von 1,25 mmol HU/kg/Std. über 16 Stunden. Die gewählte Form der HU-Verabreichung ergibt nach einer Stunde eine durchschnittliche HU-Konzentration von 1,7 mM mit einem fast linearen Anstieg auf 2,0 mM in der 16. Std. nach Infusionsbeginn (Rabes et al. 1977). Die Dauerinfusion wurde über die Schwanzvene mit einem Perfusor (Perfusor IV, Venofix Kanüle Nr. 72500, Braun, Melsungen) bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,56 ml/Std. durchgeführt. Abgesehen von einer Befestigung des Schwanzes zur Sicherung der Infusion konnten sich die Tiere frei bewegen und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. (Abkürzung: p.H.+HU)

Die Zeitpunkte für die Durchführung der partiellen Hepatektomie wurden in den beiden letzten Gruppen so gewählt, daß alle Tiere zur gleichen Tageszeit (10⁰⁰- 11⁰⁰ vormittags) getötet werden konnten, um von der Tageszeit abhängige Schwankungen in der Ultrastruktur des Hepatozyten (Bucher 1963) zu vermeiden.

3.3. Hydroxyharnstoff (HU)

HU ist eine niedermolekulare Substanz, die 1869 von Dresler und Stein erstmalig synthetisiert wurde. Die spezifisch inhibitorische Wirkung von HU auf die DNS-Synthese sowohl in vitro (Young and Hodas 1964, Sinclair 1965, Kim, Gelbard and Perez 1967, Bacchetti and Whitmore 1969, Bhuyan et al. 1973) als auch in vivo (Schwartz et al. 1965, Philips et al. 1967, Rajewski, Hülser und Fabricius 1971, Malkinson, Griem and Marianovic 1973) ist seit längerem bekannt. Der Angriffspunkt des HU auf die zelluläre DNS-Synthese wird in der Hemmung der Ribonucleosid-Diphosphat-Reduktase vermutet (Krakoff, Brown and Reichard 1968, Moore 1969, Berglund and Sjöberg 1979). Eine DNS-Synthese geringen Ausmaßes ist unter HU noch möglich. Es kommt sowohl in Viren (Magnusson 1973, Laipis 1973, Winnacker 1975) als auch in eukaryoten Zellen (Coyle and Strauss 1970, Martin et al. 1977) zu einer Anhäufung kurzer DNS-Bruchstücke, die möglicherweise mit Okazakifragmenten identisch sind (Martin et al. 1977).

Die allgemeine Toxizität des HU auf die regenerierende Rattenleber ist gering (Schwartz et al. 1965). Cytotoxische Wirkungen, die zu einem Verlust der Reproduktionsfähigkeit führen, sind auf Zellen beschränkt, die sich während der HU-Exposition in der DNS-Synthese-Phase des Zellzyklus befinden (Sinclair 1965, 1967, Kim, Gelbard and Perez 1967, Pfeiffer and Tolmach 1967, Philips et al. 1967, Bacchetti and Whitmore 1969, Farber and Baserga 1969, Bhuyan and Fraser 1974). Der früheste Beginn der DNS-Synthese nach partieller Hepatektomie liegt für die Rattenleber in der

15.-18. Std. nach Operation (Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1968, Rabes und Brändle 1969). Der in den vorliegenden Versuchen gewählte Beginn der HU-Infusion zur 14. Std. nach partieller Hepatektomie stellt somit sicher, daß sich noch keine Zellen der regenerierenden Leber in der vulnerablen DNS-Synthesephase befinden (Rabes et al. 1977).

3.4. Entnahme und Verarbeitung des Lebergewebes

Die Fixierung des Lebergewebes für die feinstrukturelle Untersuchung wurde als Perfusionsfixierung in situ (Fahimi 1967; Forssman et al. 1967) mit Glutaraldehyd durchgeführt. Dazu wurde in Äthernarkose nach rascher Eröffnung der Bauchdecken die Portalvene aufgesucht und nach Durchtrennung der unteren Hohlvene die Leber mit 3,25%igem Glutaraldehyd (pH 7,4, 20°C) mit einer Flußgeschwindigkeit von ca. 10ml in 5 min. perfundiert. Nach Entnahme der Leber wurde der rechte Leberlappen mit Rasierklingen zunächst in einige große Scheiben zerteilt. Die Leberscheiben wurden in ca. 1mm³ große Gewebestückchen zerkleinert und ca. 40 bis 50 dieser Gewebelöcke sofort in Schalen mit kaltem 6,25%igen Glutaraldehyd überführt, wo sie weitere 60 min. immersionsfixiert wurden. Anschließend wurden die Gewebelöcke mindestens 24 Std. in 0,2 M gepufferter Rohruckerlösung (pH 7,4) gewässert und zuletzt für 2 Std. in 2%iger Osmiumsäurelösung nachfixiert. Die Entwässerung des Gewebes in aufsteigender Azetonreihe und die Einbettung in Epon 812 (Luft.1961) erfolgte in üblicher Weise.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden von den eingebetteten Blöcken Semidünnschnitte (1µm) angefertigt und mit Azur II 5-30 min. bei 60° (Richardson, Janett and Finke 1960) gefärbt. Für die Elektronenmikroskopie wurden einige Gewebelöcke nach Orientierung im Lichtmikroskop entweder auf den periportal oder perivenösen Bereich des Leberlobulus zugetrimmt, wobei die Oberfläche der Blöcke

soweit verkleinert wurde, daß jeweils nur der Anschnitt eines Portalfeldes bzw. einer Zentralvene mit maximal 5-8 anschließenden Zellagen übrigblieb. Mit einem Reichert OM U3 Ultramikrotom wurden von diesen Blöcken mit Diamantmessern Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie hergestellt. Die Größe der Ultradünnschnitte wurde an Hand eines Semidünnschnittes kontrolliert, der von jedem Block im Anschluß an die Ultradünnschnitte angefertigt wurde. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfernetze mit 200 Maschen pro Netz aufgenommen und mit Uranylazetat und Bleizitrat (Reynolds 1963) kontrastiert. Die Untersuchung erfolgte mit einem Philips EM 300 Elektronenmikroskop.

3.5. Berücksichtigung der Topologie des Leberläppchens

Rappaport empfahl eine Unterteilung des Leberparenchyms in funktionelle Einheiten, ausgehend von ihrer Lage zu den zuführenden Blutgefäßen (Rappaport et al. 1954; Rappaport 1963). Demzufolge wird das Leberläppchen eingeteilt in eine um die Endaufzweigungen der V. portae und A. hepatica gelegene periportale Zone I, die die beste nutritive Versorgung und Oxygenierung erhält, eine diese umgebende intermediäre Zone II und als letztes eine perivenöse Zone III. Unter Übernahme dieses Konzepts wurde für die morphometrische Auswertung das Leberläppchen in drei gleichgroße Abschnitte zwischen Portalfeld und zugehörigen Zentralvenen unterteilt. Die Untersuchung beschränkte sich, unter Aussparung des intermediären Drittels, auf die periportalen und perivenösen Bereiche, da hier die deutlichsten Veränderungen zu erwarten waren. Innerhalb dieser Bereiche wurde keine weitere Differenzierung der Hepatozyten gemäß ihrem Abstand zu den jeweiligen Gefäßstrukturen vorgenommen. Es beziehen sich daher alle weiteren Ausführungen auf den durchschnittlichen Aufbau der Hepatozyten im periportalen bzw. perivenösen Drittel. Die Abgrenzung ist zwangsläufig etwas willkürlich, da in Wirklichkeit keine echten Grenzen, sondern nur fließende Übergänge innerhalb des Lobulus vorhanden sind.

Die Vergrößerung für die lichtmikroskopische Auswertung wurde so gewählt, daß die Größe der Testfläche im Gesichtsfeld gerade ein Drittel des durchschnittlichen Abstandes zwischen Portalfeldern und Zentralvenen betrug. Die Verkleinerung der Gewebeblöcke für die Ultradünnschnitte erfolgte ebenfalls auf dieses Maß, so daß die elektronenmikroskopischen Aufnahmen ohne weitere Orientierung bezüglich der Lage der Zellen im Lobulus vorgenommen werden konnten.

3.6. Vergrößerungsstufen

Bei der Auswertung unterschiedlich großer Bestandteile einer Zelle ist es nötig, eine stufenweise Untersuchung bei verschiedenen Vergrößerungen vorzunehmen ("multiple stage sampling", Weibel 1969). Die Vergrößerungen sollen dabei so gewählt werden, daß eine eindeutige Identifizierung der interessierenden Strukturen und eine genügend genaue Anwendung der Testsysteme möglich ist (Weibel and Bolender 1973). Die Vergrößerungen sollen jedoch nicht über das erforderliche Maß hinaus gesteigert werden, da jede Vergrößerungszunahme mit einer Verringerung des Gesichtsfeldes und damit einer Vergrößerung des statistischen Fehlers einhergeht.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in drei Vergrößerungsstufen, einer lichtmikroskopischen und zwei elektronenmikroskopischen Stufen, durchgeführt. Die Auswertung in Stufe I erfolgte im Lichtmikroskop bei 1250-facher Vergrößerung mit Ölimmersion. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden bei 2 200-facher und 10 000-facher Primärvergrößerung auf Kleinbildfilm aufgenommen. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte auf 7-fach nachvergrößerten Papierabzügen, die Endvergrößerungen betrugen 15 400-fach (Stufe II) und 71 450-fach (Stufe III).

Zur Bestimmung der elektronenmikroskopischen Vergrößerungen und ihrer Kontrolle im Verlauf der Arbeit wurde am Ende

eines jeden Kleinbildfilmes in beiden Vergrößerungsstufen je eine Aufnahme eines Kontrollrasters (1 235 Linien pro mm) angefertigt. Bei den angegebenen Endvergrößerungen handelt es sich um die Mittelwerte aus den ebenfalls 7-fach nachvergrößerten Kontrollaufnahmen beider Serien. Es lagen 70% (Stufe II) bzw. 80% (Stufe III) der Werte innerhalb $\pm 5\%$ um die Mittelwerte, die maximalen Abweichungen betrugen in beiden Stufen $\pm 8\%$.

3.7. Stichprobensammlung

Die Auswahl der Stichproben aus dem vorliegenden Untersuchungsmaterial geschah auf folgende Weise:

Von jeder Leber wurden zunächst 40-50 Gewebelöcke gewonnen, davon 15 Blöcke zufällig ausgewählt und in Epon eingebettet. Von diesen wurden Semidünnschnitte angefertigt und von den ersten 10 geeigneten Blöcken je ein läppchen-peripheres und läppchenzentrales Gesichtsfeld lichtmikroskopisch ausgewertet. Für die Elektronenmikroskopie wurden für jede Lokalisation (periportal oder perivenöser Bereich) je drei Gewebelöcke entsprechend getrimmt und ultradünn geschnitten. Nach dem zuvor beschriebenen Verfahren des systematischen Stichprobensammelns unter Verwendung des die Ultradünnschnitte tragenden Kupfernetzes (Abb. 4) wurden von einem Schnitt eines jeden Blockes 6 Aufnahmen in fortlaufender Reihenfolge gemacht.

Insgesamt wurden damit pro Tier und pro Lokalisation untersucht:

in Stufe I	: 10 Gesichtsfelder bei 1 250-facher Vergrößerung
in Stufe II	: 18 Aufnahmen bei 15400-facher Vergrößerung
in Stufe III	: 18 Aufnahmen bei 71450-facher Vergrößerung.

Bei beiden elektronenmikroskopischen Vergrößerungsstufen kam das gleiche systematische Auswahlverfahren zur Anwendung, doch wurden bei der Stufe III entsprechen dem Vorgehen von Weibel et al. (1969) diejenigen Gesichtsfelder

verworfen, die weniger als 50% Cytoplasma enthielten.

3.8. Morphometrisches Modell der Leberzelle

Bei der morphometrischen Analyse von Geweben werden die Gewebsbestandteile in Kompartimente aufgeteilt, wobei der Begriff "Kompartiment" die Gesamtheit einer entweder schon vorhandenen oder für den Einzelfall besonders definierten Struktur umfaßt (Weibel et al. 1969), z.B. Gesamtheit der Mitochondrien im Lebergewebe = mitochondriales Kompartiment. Die Bestimmung der verschiedenen Kompartimente hinsichtlich ihrer Volumendichte, ihrer Oberflächendichte und, soweit es sich um einzelne Partikel handelt, z.T. auch ihrer numerischen Dichte erfolgte bei folgenden Vergrößerungen:

(Die Abkürzungen in der Symbolschreibweise erfolgen in Anlehnung an die Nomenklatur, wie sie von Rohr et al. (1976) angegeben wird.)

Stufe I:

Volumendichte:	Extrahepatozellularraum	$V_V \text{ EX} (I)$
	Hepatozyten	$V_V \text{ H} (I)$
	Hepatozytencytoplasma	$V_V \text{ CYT} (I)$
	Hepatocytenkerne	$V_V \text{ N} (I)$
Numerische Dichte:	Hepatocytenkerne	$N_V \text{ N} (I)$

Da die großen Gefäßstrukturen bedingt durch die Wahl der Gesichtsfelder nicht mitbestimmt wurden, umfaßt der Extrahepatozellularraum nur die Sinusoide mit Kupferzellen und Disse'schem Raum, die Fettspeicherzellen und die Gallengänge.

Stufe II:

Volumendichte:	Cytoplasma	V_V CYT (II)
	Mitochondrien	V_V M (II)
	Microbodies (Peroxisomen)	V_V MB (II)
	Lysosomen (dense bodies)	V_V LY (II)
	Fett	V_V F (II)
Numerische Dichte:	Microbodies	N_V MB (II)

Zu der Gruppe der Lysosomen wurden ohne weitere Differenzierung die "dense bodies", multivesikulären Körper, peribiliären Körper, etc. gezählt. Die entscheidenden Kriterien für die Zuordnung eines Partikels zur Gruppe der Lysosomen waren in Zweifelsfällen eine dichte Innenstruktur und der Einschluß durch eine dreischichtige Einheitsmembran. Wegen der Größenunterschiede dieser heterogenen Gruppe wurde auf eine Bestimmung der numerischen Dichte der Lysosomen verzichtet. Bei den Mitochondrien fanden sich ebenfalls nicht mehr vernachlässigbare Form- und Größenunterschiede, ferner war vor allem in der Hydroxyharnstoffgruppe die Bedingung der allseitigen Konvexität nicht mehr erfüllt. Aus diesen Gründen wurde auch bei den Mitochondrien keine Bestimmung der numerischen Dichte durchgeführt.

Stufe III:

Volumendichte:	Cytoplasma	V_V CYT (III)
	rauhes endopl. Retikulum	V_V RER (III)
	glattes endopl. Retikulum	V_V SER (III)
	Grundsubstanz	V_V GS (III)
Oberflächendichte:	Mitochondrienaußenmembran	S_V MO (III)
	Mitochondrieninnenmembran	S_V MC (III)
	rauhes endopl. Retikulum	S_V RER (III)
	glattes endopl. Retikulum	S_V SER (III)
Numerische Dichte:	Ribosomen	N_V RIBO (III)

Die Gestalt des rauhen endoplasmatischen Retikulums ist in der normalen Leber wohl definiert. Unter den experimentellen Bedingungen der vorliegenden Versuche kam es jedoch teilweise zu einer blasigen Auftreibung der Zisternen, vor allem in ihren Endbereichen, mit einer Verminderung der membrangebundenen Ribosomen an diesen Stellen, so daß die Übergänge zum glatten endoplasmatischen Retikulum auf dem Schnitt manchmal fließend erschienen. Die Unterscheidung wurde so getroffen, daß alle Zisternen und Vesikel, die auf dem Schnitt erkennbar mindestens ein Ribosom an ihrer Oberfläche trugen, zum rauhen ER gezählt wurden. Dem rauhen ER zugerechnet wurden auch Membranen, denen zwar selbst keine Ribosomen aufgelagert waren, die aber auf dem Schnitt in ununterbrochener Verbindung zu ribosomentragenden Membranen standen. Des weiteren wurde der perinukleäre Spalt zum rauhen endoplasmatischen Volumen gezählt, die äußere mit Ribosomen beladene Kernmembran als Teil der rauhen ER-Membran betrachtet (Watson 1955). Ganz allgemein wurde als Volumenanteil des rauhen ER nur der Spalt zwischen den beiden die Zisternen umschließenden Membranen ohne die angrenzende Ribosomensicht gewertet. Alle nicht ribosomentragenden Vesikel und Tubuli einschließlich des Golgi-Apparates wurden dem glatten endoplasmatischen Retikulum zugerechnet. Das Kompartiment "Grundsubstanz" umfaßt den freien cytoplasmatischen Raum ausschließlich der eigens bestimmten Strukturen (Mitochondrien, Microbodies, Lysosomen, Fett, glattes und rauhes ER), jedoch einschließlich des Glykogens und der Ribosomen. Die Volumendichte der Grundsubstanz wurde unabhängig bestimmt und nicht durch Differenzbildung ermittelt. Bei den Mitochondrien besteht die Hülle bekanntlich aus einer inneren und äußeren Membran. Dabei wurde die innere Membran einschließlich der Cristae als Mitochondrieninnenmembran (MI), die äußere Membran allein als Mitochondrienaußenmembran (MO=outer membrane) bezeichnet. Diejenigen Kreuzungspunkte der Testlinien mit den Mitochondrien, bei denen die Mitochondrienaußenmembran nicht klar zu erkennen war, jedoch ein eindeutiger Übergang von Mitochondrieninnenraum zu Cytoplasmaraum vorlag, wurden ebenfalls als Schnittpunkte mit der Außenmembran gezählt.

3.9. Testsysteme:

Die Auswertung der lichtmikroskopischen Gesichtsfelder und der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit kohärenten Testsystemen (Weibel 1969). Die Untersuchungen der Stufen I und II wurden mit Hilfe des "Manuell-Optischen Bildanalysensystems MOP KM II" (Kontron, München) durchgeführt, einem elektro-optischen Gerät zur vereinfachten Anwendung morphometrischer Verfahren. Das Grundsystem dieses Gerätes besteht aus Glasplatten mit einem Quadratraster, dessen senkrecht verlaufende Linien aus hochreflektierendem Metall bestehen, während die waagrecht verlaufenden Linien nur der Führung dienen (Abb. 7 a+b). Die Glasplatten werden mit einem Stift abgetastet, in dessen Spitze eine Lichtquelle und eine Fotozelle eingebaut sind, so daß bei jedem Kreuzen einer senkrechten Linie mit dem Stift ein Impuls ausgelöst wird. Mit diesem System ist die Bestimmung der Volumendichte wie auch, in eingeschränktem Maß, die Bestimmung der Oberflächendichte möglich. Die Schnittpunkte der senkrechten Metalllinien mit den waagrecht verlaufenden Führungslinien dienen als Testpunkte für die Volumendichte, die senkrechten Linien alleine als Testlinien für die Oberflächendichte.

a) Volumendichte: Die Zählung der Testpunkte innerhalb einer Struktur erfolgt durch mäanderförmiges Abtasten des Gitters entlang der Führungslinien, wobei der Abtaststift innerhalb der interessierenden Strukturen auf der Glasplatte geführt, außerhalb der Strukturen abgehoben wird. Durch die Kreuzung mit den senkrechten Linien entstehen genauso viele Impulse, wie Testpunkte innerhalb der Struktur liegen (Abb. 7a).

b) Oberflächendichte: Bei der Zählung der Schnittpunkte der Membranen mit den Testlinien werden die interessierenden Membranen mit dem Abtaststift nachgezeichnet, so daß bei jedem Kreuzen der senkrechten Linien automatisch ein Schnittpunkt gezählt wird (Abb. 7b).

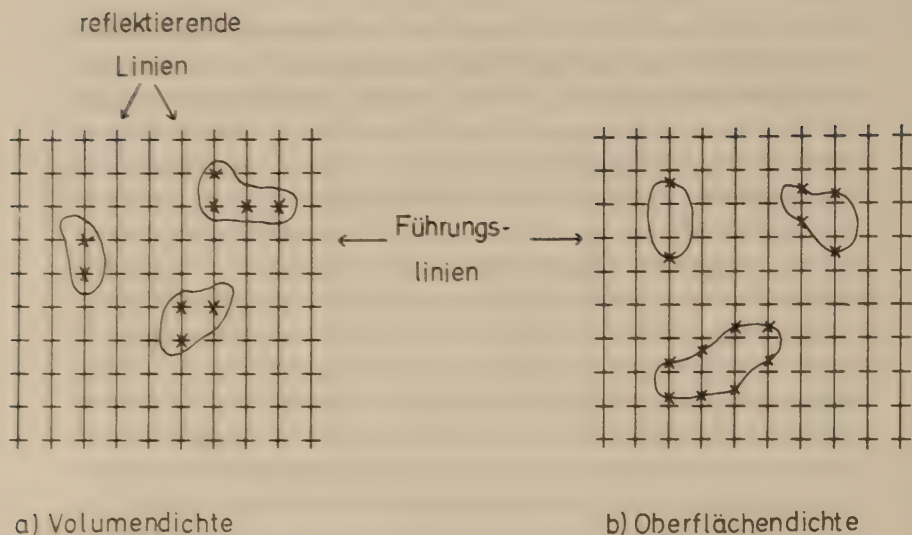


Abb. 7: Quadratrastersystem des MOP KM II

- a) Bestimmung der Volumendichte
- b) Bestimmung der Oberflächendichte

Nähere Erklärungen s. Text

Der Aufbau des Systems bedingt, daß in beiden Fällen jeweils nur ein Kompartiment pro Arbeitsgang ausgewertet werden kann. Die Zählimpulse werden einer Speichereinheit zugeführt, in der 12 verschiedene Speicherkanäle gewählt werden können. Die verschiedenen im Handel befindlichen Festgitter können a) in das lichtmikroskopische Gesichtsfeld eingespiegelt, b) mit Glasplatten auf Papierbilder aufgelegt und c) auf dem Schirm einer Projektionseinrichtung angebracht werden.

Für die Stufe I wurde ein Testgitter mit 32 Linien gewählt, mit einer Gesamtpunktzahl $P_T = 1024$, einem Gitterabstand $d_o = 3,125$ mm und einer Testfläche $A_{T_o} = 100 \text{ cm}^2$ bzw. $A_T = 6400 \text{ } \mu\text{m}^2$, bezogen auf die Vergrößerung 1250-fach.

Das Testgitter der Stufe II hatte ebenfalls 32 Linien mit der Gesamtpunktzahl $P_T = 1024$, einen Gitterabstand $d_o = 5,0$ mm und eine Testfläche A_{T_o} von 256 cm^2 bzw. $A_T = 100,8 \text{ } \mu\text{m}^2$ bei einer Vergrößerung von 15 400-fach.

Bei der Oberflächenbestimmung ist das MOP-System von seiner Konzeption her an die auszuwertenden Strukturen gebunden, d.h. um die Vorteile des Lichtstiftes zu nutzen, muß bei der Oberflächenbestimmung jede Membran ihrer ganzen Länge nach mit dem Lichtstift nachgezeichnet werden. Die Bewegung des Lichtstiftes erfolgt hierbei losgelöst von den Führungslinien, wodurch keine Orientierungshilfe mehr von außen gegeben ist. Dies verursacht keine Probleme, solange die untersuchten Strukturen relativ groß und nur in geringer Zahl über die Testfläche verteilt sind. Die Auswertung sehr kleiner Bestandteile wie z.B. der zahlreichen Vesikel des glatten endoplasmatischen Retikulums ist hiermit jedoch nicht mehr mit ausreichender Zuverlässigkeit möglich, da in diesem Fall die Übersichtlichkeit im Testfeld nicht mehr gewahrt ist.

Aus diesem Grund wurde für die Stufe III ein Mehrzweckraster nach den Angaben von Weibel et al. (1966) gezeichnet, abfotografiert und das Negativ zusammen mit den Bildnegativen vergrößert, so daß das Raster in die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einkopiert wurde (Abb. 8). Die Auswertung der Schnittpunkte der Membranen mit dem Mehrzweckraster erfolgt entlang der Testlinien, so daß hier die Orientierung von außen gegeben ist. Das Mehrzweckraster Weibels war dahingehend modifiziert worden, daß in die Testfläche noch 50 kleinere Zählfelder für die Ribosomenzählung eingezeichnet worden waren. Die Daten dieses Rasters sind wie folgt:



Abb. 8: Modifiziertes Mehrzweckkraster nach Weibel, Kistler and Scherle (1966) für die Auswertungsstufe III (71450-fache Vergrößerung), das durch das Einfügen von 50 kleinen Zählfeldern zusätzlich die Bestimmung der numerischen Dichte der Ribosomen ermöglicht.

Gesamtpunktzahl $P_T = 100$; Gesamtlänge der Testlinien $L_{T0} = 84$ cm; Testfläche $A_{T0} = 244,4$ cm²; Gesamtfläche der kleineren Zählfelder $A_{R0} = 55,125$ cm²;

bzw. auf die Vergrößerung 71 450-fach bezogen:

$P_T = 100$; $L_T = 11,8$ μ m; $A_T = 4,8$ μ m²; $A_R = 1,1$ μ m²

3.10. Bestimmung der Schnittdicke der Ultradünnschnitte

Bei der Berechnung der numerischen Dichte der Ribosomen aus der Anzahl ihrer Anschnitte im Testfeld muß die Schnittdicke der Ultradünnschnitte berücksichtigt werden, da die Ribosomen in der Größenordnung der Schnittdicke liegen. Zur Bestimmung der Schnittdicke wurde ein von Small (1968) vorgeschlagenes Verfahren angewandt,

Jeder Ultradünnschnitt enthält kleine Falten, die durch Aufwerfungen des Präparates beim Aufnehmen des Schnittes aus dem Wasserschliff des Ultramikrotoms auf das tragende Kupfernetz entstehen. Wenn die Falten klein genug sind, bleiben sie senkrecht zur Schnittebene stehen ohne umzufallen oder schrägzuliegen und damit beträgt in der Aufsicht die Breite der Falten genau das Doppelte der Schnittdicke. Ferner läßt sich in der Mitte der Falten ein feiner Längsstrich erkennen, der die Position der beiden innerliegenden Flächen der Falte markiert (Abb. 9). Die Kriterien für die Auswahl der Falten sind a) ein scharfer Übergang zur Umgebung und b) die Lage des Mittelstriches genau in der Mitte des Faltenverlaufs. Beide Kriterien zusammen sind das Zeichen dafür, daß keine Verbreiterung der Faltenbasis oder -spitze und keine Schräglage der Falte vorliegen.

Bei dieser Untersuchung wurden die Falten bei der Vergrößerungsstufe III (71 450-fach) aufgenommen. Aus der genauen Kenntnis der Vergrößerung ließ sich durch einfaches Ausmessen der Faltenbreite die Schnittdicke des jeweiligen Präparates bestimmen. Insgesamt wurden 30 Falten fotografiert, von denen 17 zur Auswertung herangezogen wurden. Es



Abb. 9: Schnittdickenbestimmung der Ultradünnschnitte mit Hilfe kleiner Falten (Small 1968). Bei kleinen Falten, die senkrecht zur Schnittebene stehen bleiben, beträgt die Breite der Falten genau das Doppelte der Schnittdicke. Nähere Angaben siehe Text.

ergab sich ein Mittelwert von $470 \text{ \AA}$ (Standardabweichung $\pm 80 \text{ \AA}$), mit einem Minimalwert von $350 \text{ \AA}$ und einem Maximum von $560 \text{ \AA}$.

3.11. Berechnung der stereologischen Parameter

Die Berechnung der stereologischen Parameter ebenso wie die abschließende statistische Behandlung der Werte wurde auf einer Olivetti Rechenmaschine P 652 mit Hilfe selbst entwickelter Rechenprogramme vorgenommen.

3.11.1. Begriffsdefinitionen

Die Meßdaten, die bei der Auswertung der 2-dimensionalen Bilder gewonnen werden (P_p , I_L , N_A), werden als "Primärdaten" bezeichnet, die stereologischen Grundparameter (V_V , S_V , N_V) als "Primärparameter". Wie bereits erwähnt, können die Primärparameter auf das Einheitsvolumen 1 cm^3 verschiedener Grundgrößen bezogen werden. Die sich daraus ergebenden Werte werden "Sekundärparameter" genannt. Die üblichen Bezugsgrößen sind: 1 cm^3 Lebergewebe, 1 cm^3 Hepatozyten und 1 cm^3 Hepatozytencytoplasma. Über die numerische Dichte der Hepatozytenkerne kann auch eine Berechnung "pro Einzelhepatozyt" erfolgen. Dabei ist zu beachten, daß bei der Zählung der Zellkerne keine Unterscheidung zwischen ein- und zweikernigen Zellen vorgenommen wird, d.h. es wird ein fiktiver "mononukleärer Hepatozyt" konstruiert, indem jedem Zellkern ein durchschnittliches Hepatozytenvolumen zugeordnet wird. Je nach Fragestellung sind noch weitere Bezugsgrößen und damit weitere Sekundärparameter denkbar, z.B. pro 1 cm^3 Mitochondrien oder 1 cm^3 glattes ER.

Am Beispiel der Oberflächendichte der Mitochondrienaußenmembran $S_V M_O$ soll die Symbolschreibweise der Sekundärparameter gezeigt werden:

$$\begin{aligned}
 S_V \text{ MO pro cm}^3 \text{ Lebergewebe} &: S_V \text{ MO} \\
 S_V \text{ MO pro cm}^3 \text{ Cytoplasma} &: \frac{S_V \text{ MO}}{V_V \text{ CYT}} \\
 S_V \text{ MO pro cm}^3 \text{ Mitochondrien} &: \frac{S_V \text{ MO}}{V_V \text{ M}} \\
 S_V \text{ MO pro Einzelhepatozyt} &: \frac{S_V \text{ MO}}{N_V \text{ N}}
 \end{aligned}$$

3.11.2. Berechnung der Primärparameter

3.11.2.1. Zusammenfassung der Meßwerte

Wegen des kleinen Gesichtsfeldes im Elektronenmikroskop kann die Einzelaufnahme der Vergrößerungsstufen II und III nicht als repräsentative Stichprobe des betreffenden Blockes angesehen werden. Als Einzelstichprobe wurden daher die aus allen 6 Aufnahmen pro Block gesammelten Werte verrechnet. ("Gruppenmethode", Lorenz 1977)

Von nun an war das weitere Vorgehen in allen Vergrößerungsstufen identisch. Aus den Werten der Blöcke pro Leber wurden die Tiermittelwerte berechnet, die wiederum die Grundlage für die Berechnung der Gruppenmittelwerte waren. Dabei wurde die Umrechnung der Primärdaten in die Primärparameter mit den entsprechenden stereologischen Formeln auf der Ebene der Tiermittelwerte vorgenommen. Die Sekundärparameterberechnung erfolgte ebenfalls getrennt für jedes einzelne Tier, so daß bei der Bildung der Gruppenmittelwerte für alle Primär- und Sekundärparameter die Angabe der Standardabweichung bzw. des Standardfehlers möglich war (Stichprobenzahl $n = 4$ Tiere pro Gruppe).

3.11.2.2. Anwendung der stereologischen Formeln

In diesem Abschnitt wird die konkrete Anwendung der stereologischen Formeln mit Angabe der jeweiligen Dimensionen er-

läutert:

Volumendichte (V_V):

$$V_V \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3} = \text{cm}^0 \right] = P_P = \frac{P_i}{P_T} \left[\frac{\text{cm}^0}{\text{cm}^0} = \text{cm}^0 \right] ;$$

Wie sich aus den Dimensionen ersehen läßt, handelt es sich bei der Volumendichte um einen reinen Verhältniswert. Aus diesem Grund geht die Vergrößerung nicht mit in die Gleichung ein. Das bedeutet allgemein, daß für morphometrische Arbeiten, die nur Volumenbestimmungen zum Ziel haben, eine Bestimmung der Vergrößerung nicht notwendig ist.

Rechenbeispiel: Volumendichte der Mitochondrien (V_{VM}):

$$V_{VM}^{(II)} = \frac{P_M^{(II)}}{P_T^{(II)}} = \frac{P_M^{(II)}}{1024} ;$$

P_M = Testpunkte auf Mitochondrien, P_T = Gesamtpunktzahl

Der Einfluß der Schnittdicke ("Holmes-Effekt") kann in den elektronenmikroskopischen Stufen bei der Berechnung der Volumendichte vernachlässigt werden, da bei einer Schnittdicke der Ultradünnschnitte von ca. 500 Å das Verhältnis von mittlerem Strukturdurchmesser und Schnittdicke für Mitochondrien, Microbodies und Lysosomen im allgemeinen größer als 10 : 1 ist. In der Stufe I hingegen ist bei der Volumenbestimmung der Hepatozytenkerne eine Schnittdicke der Semidünnschnitte von ca. 1 µm gegenüber einem mittleren Kerndurchmesser von ca. 8 µm gegeben. Aus dem Verhältnis von 8 : 1 läßt sich nach Gleichung (10) eine Überschätzung des Kernvolumens von ca. 19% errechnen. Auf eine Korrektur wurde dennoch verzichtet, da davon ausgegangen wurde, daß durch den Verlust an kleinen Schnittprofilen (Kernanschnitte mit einem Durchmesser kleiner als 3 µm sind nicht mehr erkennbar) die Volumenüberschätzung kompensiert wird (s. Kap. 2.4.4.).

Oberflächendichte (S_V):

$$S_V = 2 \cdot I_L = 2 \cdot \frac{I_i \cdot V}{L_{To}} ;$$

I_i = Zahl der Schnittpunkte

L_T = Testlinienlänge (auf die Vergrößerung bezogen)

L_{To} = Testlinienlänge (auf das Testsystem bezogen)

V = Vergrößerung

Die Angabe der Oberflächendichte erfolgt meist in m^2/cm^3 .
Bei der Angabe von L_{To} in cm errechnet sich diese Dimension wie folgt:

$$cm^{-1} = \frac{cm^2}{cm^3} = 10^{-4} \frac{m^2}{cm^3} ;$$

Die vollständige Formel lautet somit:

$$S_V = 2 : V \cdot 10^{-4} \frac{I_i}{L_{To}} \left[\frac{m^2}{cm^3} \right] ; \quad (L_{To} \text{ in cm})$$

Rechenbeispiel: Oberflächendichte der Mitochondrienaußenmembran ($S_{V MO}$)

$$\begin{aligned} S_{V MO}(III) &= 2 \cdot V(III) \cdot \frac{I_{MO}(III)}{L_{To}(III)} \\ &= 2 \cdot 71450 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{I_{MO}(III)}{84 \text{ (cm)}} \\ &= 0,170 \cdot I_{MO}(III) \left[\frac{m^2}{cm^3} \right] ; \end{aligned}$$

Wegen der unter 2.4.4. besprochenen Unsicherheit über Richtung und Größe eventueller Korrekturfaktoren werden hier für die Oberflächendichten nur die unkorrigierten Werte angegeben.

Numerische Dichte (N_V):

a) Berechnung nach der Formel von Knight, Weibel und Gomez (1963) (Gleichung 9):

$$N_V = \frac{K}{\beta} \cdot \frac{N_A^{3/2}}{V^{1/2}} = \frac{K}{\beta} \cdot \frac{(N_i/A_T)^{3/2}}{(P_i/P_T)^{1/2}} ;$$

In kohärenten Quadratrastersystemen gilt:

$$A_T = P_T \cdot d^2$$

Daraus folgt:

$$\begin{aligned} N_V &= \frac{K}{\beta} \cdot \frac{(N_i/P_T \cdot d^2)^{3/2}}{(P_i/P_T)^{1/2}} \\ &= \frac{K}{\beta} \cdot \frac{1}{P_T \cdot d^3} \cdot \frac{N_i^{3/2}}{P_i^{1/2}} \\ &= \frac{K}{\beta} \cdot \frac{V^3}{P_T \cdot d_o^3} \cdot \frac{N_i^{3/2}}{P_i^{1/2}} ; \end{aligned}$$

N_i = Anzahl der Partikelanschnitte i

d = Gitterabstand des Quadratrasters (Vergrößerungsbezogen)

d_o = Gitterabstand des Quadratrasters (rasterbezogen)

V = Vergrößerung

K = Größenverteilungskoeffizient

β = Formfaktor

Die Dimension errechnet sich bei Angabe von d_o in cm zu:

$$\text{cm}^{-3} = \frac{\text{cm}^0}{\text{cm}^3} ;$$

Diese Formel wurde für die Berechnung der numerischen

Dichte der Hepatozytenkerne und Microbodies angewandt. Für den Formfaktor β und den Größenverteilungskoeffizienten K wurden folgende Werte gewählt:

Hepatozytenkerne: $\beta = 1,38$; $K = 1,03$;

Microbodies : $\beta = 1,45$; $K = 1,03$;

Diese Werte wurden aus den Angaben von Weibel et al. (1969) übernommen. Die Hepatozytenkerne werden hierbei als kugelige Körper betrachtet und erhalten den Faktor $\beta = 1,38$ zugeordnet. Die Microbodies werden in erster Näherung als Rotationsellipsoide angesehen, wobei $\beta = 1,45$ einem Achsenverhältnis von 1 : 1,5 entspricht. Der Faktor $K = 1,03$ ergibt für die Größenverteilung einen Variationskoeffizienten von 14%. (Variationskoeffizient = Standardabweichung/Mittelwert)

Rechenbeispiel: Numerische Dichte der Hepatozytenkerne $N_V N(I)$:

$$\begin{aligned} N_V N(I) &= \frac{K}{\beta} \cdot \frac{V(I)^3}{P_T(I) \cdot d_o(I)^3 \text{ (cm}^3\text{)}} \cdot \frac{N_N^{3/2}}{P_N^{1/2}} \\ &= \frac{1,03}{1,38} \cdot \frac{1250^3}{1024 \cdot 0,3125^3} \cdot \frac{N_N^{3/2}}{P_N^{1/2}} \quad [\text{cm}^{-3}] \\ &= 4,665 \cdot \frac{N_N^{3/2}}{P_N^{1/2}} \quad [\text{cm}^{-3}] ; \end{aligned}$$

Wie bei der allgemeinen Besprechung dieser Formel erwähnt wurde, gilt sie nur unter der Bedingung, daß die untersuchten Partikel konvex und von ähnlicher geometrischer Gestalt sind (Weibel 1974). Bei den Leberzellkernen und den Microbodies sind diese Bedingungen erfüllt. Bei den Lebermitochondrien hingegen, die sehr unterschiedliche Schnittbilder mit teilweise gekrümmten und schüsselförmigen Formen erkennen lassen, die pro Bild mehr als einen Anschnitt er-

geben können, wird die Anwendung dieser Formel sicherlich unrichtige Ergebnisse liefern. Es wurde daher auf die Berechnung der numerischen Dichte der Mitochondrien verzichtet.

b) Berechnung nach der Formel von Haug (1967) (Gleichung 13):

$$\begin{aligned} N_V &= N_A \cdot \frac{1}{\bar{D} + T - 2k} = \frac{N_i}{A_T} \cdot \frac{1}{\bar{D} + T - 2k} \\ &= \frac{N_i \cdot V^2}{A_{To}} \cdot \frac{1}{\bar{D} + T - 2k} ; \end{aligned}$$

Diese Formel wurde für die Berechnung der Ribosomenzahl angewandt, da wegen der geringen Größe der Ribosomen eine Berücksichtigung der Schnittdicke erforderlich war.

N_i = Zahl der Anschnitte 1

N_A = Anschnitte pro Testfläche

A_{To} = Testfläche

V = Vergrößerung

$\bar{D}$ = mittlerer Durchmesser

T = Schnittdicke

k = Höhe eines gerade noch erkennbaren Kappenanschnittes

Zur Berechnung der numerischen Dichte wurden die Ribosomen näherungsweise als kugelige Körper mit einem mittleren Durchmesser $\bar{D} = 150 \text{ \AA}$ betrachtet. Über die Messung der größten und kleinsten sichtbaren Ribosomendurchmesser errechnete Simar (1973) mit Hilfe der in Abb. 10 angegebenen Beziehungen die Höhe k eines gerade noch erkennbaren Kappenanschnittes als $k = 1/4\bar{D}$. Für die Schnittdicke T wurde der gemessene Mittelwert $T = 470 \text{ \AA}$ eingesetzt.

Für die Ribosomenzählfläche im Mehrzweckraster der Stufe III mit $A_{Ro} = 55,125 \text{ cm}^2$ und der Vergrößerung von 71450-

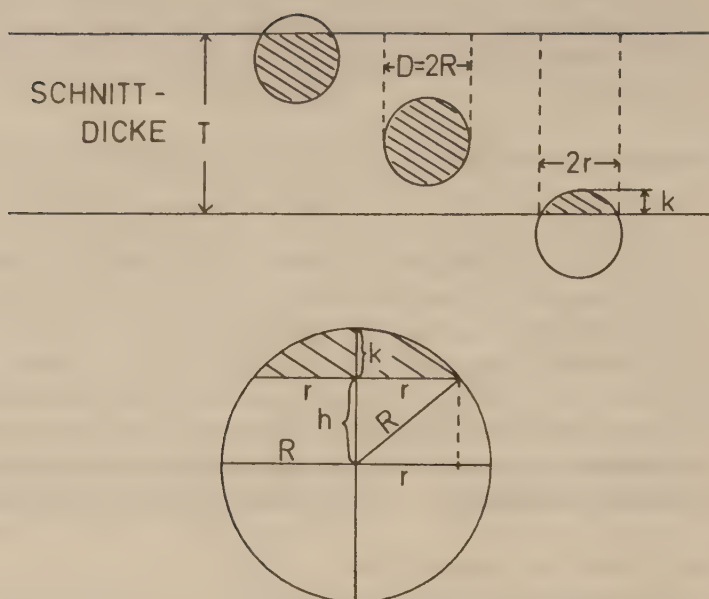


Abb. 10: Zusammenhänge zwischen Schnittkreisradius r und Höhe des Kappenanschnittes k .

D = Partikeldurchmesser

R = Kugelradius

r = Schnittkreisradius

k = Höhe des Kappenanschnittes

Es gilt: $R = h + k$;

$$R^2 = h^2 + r^2 ;$$

Die Auflösung nach k ergibt:

$$k = R \pm \sqrt{R^2 - r^2}$$

Da k definitionsgemäß kleiner ist als R , läßt sich mit der Beziehung $k = R - \sqrt{R^2 - r^2}$ aus größtem und kleinstem Schnittkreisradius der sichtbaren Ribosomen die Höhe k eines gerade noch erkennbaren Kappenanschnittes berechnen.

fach lautet die vollständige Berechnung der numerischen Dichte der Ribosomen $N_V \text{ RIBO}$:

$$\begin{aligned} N_V \text{ RIBO} &= \frac{N_{\text{RIBO}} \cdot 71450^2}{55,125 \text{ (cm}^2\text{)}} \cdot \frac{1}{150 + 470 - 75 \text{ (\AA)}} \\ &= \frac{N_{\text{RIBO}} \cdot 71450^2}{55,125 \text{ (cm}^2\text{)}} \cdot \frac{1}{545 \cdot 10^{-8} \text{ (cm)}} \\ &= 0,1699 \cdot 10^{14} \cdot N_{\text{RIBO}} \left[\text{cm}^{-3} \right] ; \end{aligned}$$

Die Berechnung der numerischen Dichte der Ribosomen kann trotz dieser Formel nur einen Näherungswert liefern, da erstens die Angaben von $\bar{D}$ und k auf vergleichsweise groben Bestimmungen beruhen und zweitens auch die Fehler bei der Zählung der Ribosomen auf dem elektronenmikroskopischen Bild nicht unerheblich sein dürften.

3.11.3. Berechnung der Sekundärparameter

Die im Prinzip in allen Vergrößerungsstufen gleichartige Erfassung der Stichproben ist die Voraussetzung dafür, daß die Primärparameter der einzelnen Stufen zur Sekundärparameterbildung miteinander in Beziehung gesetzt werden können. Die Ermittlung der Zellparameter in 3 verschiedenen Vergrößerungsstufen bewirkt dennoch eine gewisse Überschneidung der jeweiligen Stichprobenfehler. Durch die Einführung von sog. "Korrekturfaktoren" wurde in Anlehnung an Rohr et al. (1976) versucht, eine bessere Anpassung der Werte verschiedener Vergrößerungsstufen untereinander zu erreichen.

Es wird hierzu ein Bezugssystem benötigt, das in allen 3 Vergrößerungsstufen gleichermaßen bestimmt werden kann. Ausgehend von der Aufgabenstellung der elektronenmikroskopischen Stufen, nämlich der vorwiegenden Untersuchung des

cytoplasmatischen Raumes, bietet sich das Cytoplasmavolumen selbst als Bezugssystem an. Die Volumina des Lebergewebes bzw. der Hepatozyten sind in den elektronenmikroskopischen Stufen als Bezugssystem nicht geeignet, da der Extrahepatozellularraum und die Hepatozytenuclei bei dem kleinen Gesichtsfeld der elektronenmikroskopischen Aufnahmen nur in sehr wechselndem Umfang vorkommen und keine verlässliche Bestimmung erlauben.

Für die Berechnung der Sekundärparameter wurde folgender Weg eingeschlagen:

Wegen des vergleichsweise großen Gesichtsfeldes und der großen Anzahl von Blöcken in der Lichtmikroskopie wurde der in Stufe I bestimmte Cytoplasmaanteil $V_{V\text{ CYT}}(I)$ als der beste Schätzwert für den wahren Anteil des Hepatozytencytoplasmas am Gesamtlebervolumen $V_{V\text{ CYT}}$ betrachtet.

$$V_{V\text{ CYT}} = V_{V\text{ CYT}}(I)$$

Mit den Korrekturfaktoren K_2 und K_3 wurden die in den beiden elektronenmikroskopischen Stufen bestimmten Cytoplasmaanteile $V_{V\text{ CYT}}(II)$ und (III) auf den Wert der Stufe I korrigiert.

$$V_{V\text{ CYT}} = V_{V\text{ CYT}}(I) = K_2 \cdot V_{V\text{ CYT}}(II) = K_3 \cdot V_{V\text{ CYT}}(III)$$

wobei:

$$K_2 = \frac{V_{V\text{ CYT}}(I)}{V_{V\text{ CYT}}(II)} \quad \text{und} \quad K_3 = \frac{V_{V\text{ CYT}}(I)}{V_{V\text{ CYT}}(III)}$$

$V_{V\text{ CYT}}$ = wahrer Cytoplasmaanteil am Gesamtlebervolumen

$V_{V\text{ CYT}}(I), (II), (III)$ = gemessene Cytoplasmaanteile der Stufen I, II, III

K_2, K_3 = Korrekturfaktoren für die Stufen II und III

Nach der Berechnung der Korrekturfaktoren wurden alle Primärparameter der Stufen II und III mit den Faktoren K_2 und

K3 multipliziert. Rechnerisch gesehen befanden sich nach der Korrektur die Werte sämtlicher Vergrößerungsstufen auf der Ebene der Stufe I und konnten nun zur Sekundärparameterbildung beliebig miteinander in Beziehung gesetzt werden. Die Korrekturfaktoren selbst wurden, wie die Primär- und Sekundärparameter, getrennt für jedes Tier und für jede Lokalisation berechnet.

Es muß jedoch erklärend hinzugefügt werden, daß die Korrekturfaktoren in Wirklichkeit nur bei denjenigen Sekundärparametern wirksam werden, bei denen Beziehungen über die Vergrößerungsstufen hinweg hergestellt werden, z.B.:

a) Volumendichte der Mitochondrien pro 1cm^3 Hepatozyten:

$$\frac{V_{V M}}{V_{V H}} = \frac{K2 \cdot V_{V M}^{(II)}}{V_{V H}^{(I)}} ;$$

b) Oberflächendichte der Mitochondrienaußenmembran pro Einzelhepatozyt:

$$\frac{S_{V MO}}{N_{V N}} = \frac{K3 \cdot S_{V MO}^{(III)}}{N_{V N}^{(I)}} ;$$

Bleibt die Sekundärparameterbildung hingegen innerhalb einer Vergrößerungsstufe, dann erscheinen die gleichen Korrekturfaktoren sowohl im Zähler wie im Nenner und werden somit weggekürzt, z.B.:

a) Volumendichte der Mitochondrien pro 1 cm^3 Cytoplasma:

$$\frac{V_{V M}}{V_{V CYT}} = \frac{K2 \cdot V_{V M}^{(II)}}{K2 \cdot V_{V CYT}^{(II)}} = \frac{V_{V M}^{(II)}}{V_{V CYT}^{(II)}} ;$$

b) Oberfläche der Mitochondrienaußenmembran pro 1 cm³
Mitochondrien:

$$\frac{S_{V \text{ MO}}}{V_{V \text{ M}}} = \frac{K3 \cdot S_{V \text{ MO}}^{(III)}}{K3 \cdot V_{V \text{ M}}^{(III)}} = \frac{S_{V \text{ MO}}^{(III)}}{V_{V \text{ M}}^{(III)}} ;$$

c) Volumendichte des rauhen endoplasmatischen Retikulums
pro 1 cm³ Cytoplasma:

$$\frac{V_{V \text{ RER}}}{V_{V \text{ CYT}}} = \frac{K3 \cdot V_{V \text{ RER}}^{(III)}}{K3 \cdot V_{V \text{ CYT}}^{(III)}} = \frac{V_{V \text{ RER}}^{(III)}}{V_{V \text{ CYT}}^{(III)}} ;$$

An den Beispielen der zweiten Gruppe wird der Vorteil der mehrfachen Cytoplasmavolumenbestimmung ($V_{V \text{ CYT}}^{(I)-(III)}$) und der doppelten Mitochondrienvolumenbestimmung ($V_{V \text{ M}}^{(II)}$ und (III)) deutlich. Sie erlauben die Bildung zahlreicher Sekundärparameter innerhalb einer Vergrößerungsstufe. Die Anwendung der Korrekturfaktoren wird somit auf das unvermeidliche Maß beschränkt.

3.12. Statistik *

3.12.1. Problemstellung

Von jedem der 12 Versuchstiere wurden für alle Primär- und Sekundärparameter zwei Werte getrennt nach periportal und perivenöser Lokalisation gewonnen. Aus den 24 Einzelwerten können insgesamt 6 Gruppenmittelwerte errechnet werden.

* Für die Beratung bei der Anlage der statistischen Tests möchte ich Herrn PD Dr. Selbmann vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik, Klinikum Großhadern, München, sehr herzlich danken.

Behandlungs- gruppen	Lokalisation	
	P	V
Kontrolle	$\bar{x}_{1.1}$	$\bar{x}_{1.2}$
p.H.	$\bar{x}_{2.1}$	$\bar{x}_{2.2}$
p.H. + HU	$\bar{x}_{3.1}$	$\bar{x}_{3.2}$

Beim Vergleich der Gruppenmittelwerte auf signifikante Unterschiede ist es wünschenswert zu trennen,

- 1) ob die Unterschiede zwischen den Werten durch die unterschiedliche Behandlung der Gruppen hervorgerufen werden;
- 2) ob die Unterschiede lokalisationsbedingt sind;
- 3) wenn ein Einfluß der Behandlungen vorliegt, ob eine annähernd parallele Entwicklung der Werte in beiden Lokalisationen zu beobachten ist, oder ob eine spezielle "Wechselwirkung" zwischen den Behandlungen und einer der Lokalisationen vorliegt.

Zur Prüfung dieser Fragestellung wurde unter Annahme einer Normalverteilung der Daten ein varianzanalytisches Testverfahren angewandt. Bei dem vorliegenden Versuchsaufbau bot sich das Modell einer "partiell hierarchischen Varianzanalyse" an, wobei entsprechend der statistischen Terminologie die Behandlungen und die Lokalisationen als "fixe" Faktoren, die Tiere hingegen als "Random" Faktor bezeichnet werden.

3.12.2. Varianzanalytisches Modell

Die Varianzanalyse gestattet es, die Streuung der 24 Einzelwerte um den aus den Einzelwerten errechneten Gesamtmittelwert in einzelne Streuungsursachen aufzugliedern.

$$SAQ_{Tot} = SAQ_T + SAQ_L + SAQ_{TL} + SAQ_a + SAQ_\epsilon$$

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

SAQ_{Tot} = Gesamtstreuung

SAQ_T = Streuung durch den Einfluß der Behandlungen

SAQ_L = Streuung durch die Lokalisation

SAQ_{TL} = Streuung durch die Wechselwirkung zwischen Behandlungen und Lokalisation

SAQ_a = Streuung durch die individuellen Schwankungen der Tiere innerhalb der Gruppen

SAQ_ε = Streuung durch den "Versuchsfehler", womit der Restanteil an Streuung bezeichnet wird, der nicht den vorher aufgeführten Ursachen zugeordnet werden kann.

Die so aufgegliederten Streuungsursachen können mit Hilfe des F-Testes daraufhin überprüft werden, ob ihre Abweichungen noch als zufällig oder als nicht mehr zufällig bezeichnet werden können.

Die Varianzanalysetabelle (Tab. 3) zeigt in allgemeiner Form die Berechnung der einzelnen Streuungsursachen und der zugehörigen F-Werte, die Tabellen 2 und 4 erläutern die Anwendung an einem konkreten Beispiel aus diesem Versuch. Die Werte wurden dabei der Übersichtlichkeit wegen auf zwei Nachkommastellen gerundet.

Wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist, wird die Streuung durch die Behandlungen (SAQ_T) aus den 3 Randmittelwerten der Behandlungsgruppen ($\bar{x}_{1..}$, $\bar{x}_{2..}$, $\bar{x}_{3..}$) und die Streuung durch die Lokalisation (SAQ_L) aus den beiden Lokalisationsmittelwerten ($\bar{x}_{..1}$, $\bar{x}_{..2}$) berechnet, d.h. die beiden entsprechenden F-Werte ergeben eine Gesamtbeurteilung der Behandlungsgruppen bzw. der Lokalisationen. Eine weitergehendere Differenzierung erfolgt bei der Berechnung von SAQ_{TL} ("Wechselwirkung") aus den 6 Gruppenmittelwerten ($\bar{x}_{1.1}$ bis $\bar{x}_{3.2}$).

		Lokalisation			
	Tier-Nr.	P	V	$\bar{x}_{ij.}$	
Kontrolle	1	2.55	3.37	2.96	
	2	3.01	3.98	3.50	
	3	2.29	3.29	2.79	
	4	0.70	3.13	1.91	
$\bar{x}_{1.h}$		2.14	3.44		$\bar{x}_{1..} = 2.79$
14h nach partieller Hepatek- tomie	5	4.21	5.11	4.66	
	6	4.52	8.66	6.59	
	7	3.82	6.90	5.36	
	8	4.06	5.45	4.75	
$\bar{x}_{2.h}$		4.15	6.53		$\bar{x}_{2..} = 5.34$
HU 14.-30h nach part. Hepatek- tomie	9	2.04	6.82	4.43	
	10	4.09	6.67	5.38	
	11	3.78	5.74	4.76	
	12	4.93	5.30	5.12	
$\bar{x}_{3.h}$		3.71	6.13		$\bar{x}_{3..} = 4.92$
$\bar{x}_{..h}$		3.33	5.37		$\bar{x}_{...} = 4.35$

Tab. 2: Rechenbeispiel zur Varianzanalyse *)

$S_{V\text{SER}}$: Oberflächendichte des glatten endoplasmatischen Retikulums pro 1 cm³ Lebergewebe
(Dimension m²/cm³)

*) Die Ausführung der Tabellen 2-4 erfolgte in Anlehnung an Selbmann (1978).

Streuungs- ursache	SAQ	FG	F-Werte
Behand- lungen T	$n \cdot K \sum_{i=1}^K (\bar{x}_{i..} - \bar{x}_{...})^2$	K-1	$F_T = \frac{K(n-1) \cdot \text{SAQ}_T}{K-1 \cdot \text{SAQ}_a}$
Lokalisa- tion L	$n \cdot K \sum_{h=1}^H (\bar{x}_{..h} - \bar{x}_{...})^2$	H-1	$F_L = \frac{K(n-1) \cdot \text{SAQ}_L}{H-1 \cdot \text{SAQ}_\epsilon}$
Wechsel- wirkung TL	$n \cdot \sum_{i=1}^K \sum_{h=1}^H (\bar{x}_{i..h} - \bar{x}_{i..} - \bar{x}_{..h} + \bar{x}_{...})^2$	(K-1) · (H-1)	$F_{TL} = \frac{K(n-1) \cdot \text{SAQ}_{TL}}{K-1 \cdot \text{SAQ}_\epsilon}$
Tiere a innerhalb der Be- handlungen	$H \cdot \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^n (\bar{x}_{ij.} - \bar{x}_{i..})^2$	K(n-1)	$F_a = \frac{(H-1) \cdot \text{SAQ}_a}{K(n-1) \cdot \text{SAQ}_\epsilon}$
Fehler ε	$\text{SAQ}_{\text{Tot}} - \text{SAQ}_T - \text{SAQ}_L - \text{SAQ}_{TL} - \text{SAQ}_a$	K(n-1) · (H-1)	-
Total	$\sum \sum \sum (x_{ijh} - \bar{x}_{...})^2$	nKH-1	

Tab. 3: Allgemeine Varianzanalysetabelle für einen partiell hierarchischen Aufbau. *)

Abk.: i = laufender Zähler für die Behandlungsgruppen K
(K = 3 Gruppen)
j = laufender Zähler für die Tiere n pro Gruppe (n=4)
h = laufender Zähler für die Lokalisationen H (H=2)
FG= Freiheitsgrade
SAQ=Summe der Abweichungsquadrate

Streuungs- ursache	SAQ	FG	F-Werte	einzelne ausgewählte Tabellenwerte der F-Verteilung
Behand- lungen T	29,9	2	$F_T = 16,08$	$F_{\text{Tab}}(2;9;\alpha=0,005) = 10,11$ $p < 0,005$
Lokalisa- tion L	24,9	1	$F_L = 24,21$	$F_{\text{Tab}}(1;9;\alpha=0,001) = 22,86$ $p < 0,001$
Wechsel- wirkung TL	1,6	2	$F_{TL} = 0,79$	$F_{\text{Tab}}(2;9;\alpha=0,10) = 3,01$ $p > 0,10$
Tiere a	8,4	9	$F_a = 0,91$	$F_{\text{Tab}}(9;9;\alpha=0,10) = 2,44$ $p > 0,10$
Fehler ε	9,3	9	-	
Total	74,1	23	-	

Tab. 4: Rechenbeispiel ($S_{V\text{SER}}$) zur Varianzanalysetabelle Tab. 3 mit Angabe einzelner ausgewählter Tabellenwerte der F-Verteilung. *)

In diesem Beispiel ergeben sich bezüglich der Behandlungen ($p < 0,005$) und der Lokalisation ($p < 0,001$) signifikante Unterschiede.

Es wird hierbei für jede Behandlungsgruppe die Differenz zwischen periportalem und perivenösem Wert gebildet. Anschließend werden die Differenzwerte auf ihre Unterschiede getestet. Bei einer annähernd gleichen Auswirkung der Behandlungen auf die beiden Lokalisationen liegen die 3 Differenzwerte ($\bar{x}_{1.1} - \bar{x}_{1.2}$; $\bar{x}_{2.1} - \bar{x}_{2.2}$; $\bar{x}_{3.1} - \bar{x}_{3.2}$) in der gleichen Größenordnung, bei einem unterschiedlichen Einfluß werden sich die Differenzen unterscheiden und ab einer gewissen Größenordnung statistisch signifikante Resultate liefern.

Die Varianzanalyse erlaubt nur die Aussage, ob sich die untersuchten Mittelwerte überhaupt unterscheiden, d.h. ob zwischen mindestens zwei Werten ein nicht mehr zufälliger Unterschied besteht. Der gezielte Vergleich bestimmter Mittelwerte wurde im Anschluß an die Varianzanalyse mit dem "Scheffé-Test" durchgeführt. Der Scheffé-Test wurde zur weiteren Aufgliederung der Faktoren "Behandlung", "Lokalisation" und "Wechselwirkung" vorgenommen, wenn vorher die Varianzanalyse einen signifikanten Wert ergab. Auf rechnerische Einzelheiten des Scheffé-Testes soll hier nicht weiter eingegangen werden. Eine ausführliche Darstellung findet sich bei Brownlee (1965). Es sei nur erwähnt, daß bei dem vorliegenden Versuchsaufbau die F-Werte der Einzelvergleiche aus dem Scheffé-Test den Summenwert aus der Varianzanalyse nicht übersteigen können. Es ist sogar möglich, daß trotz einer signifikanten Aussage in der Varianzanalyse keiner der zugehörigen Einzelvergleiche denselben signifikanten Wert erreicht. Dies läßt sich im wesentlichen darauf zurückführen, daß es sich bei dem Scheffé-Test von seinem Aufbau her um einen konservativeren Test als bei der Varianzanalyse handelt.

Zum leichteren Verständnis der Tabellen im Anhang soll an dem Beispiel der Oberflächendichte des glatten endoplasmatischen Retikulums ($S_V \text{ SER}$) die Art der tabellarischen Zusammenstellung der Werte und die Darstellung der Statistik besprochen werden (Tab. 5).

Oberflächendichte des glatten endoplasmatischen
Retikulums (S_{VSER})

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3	
	P	V
Kontrolle	2,139 (0,503)	3,442 (0,187)
p.H.	4,151 (0,147)	6,533 (0,810)
p.H.+HU	3,709 (0,609)	6,134 (0,366)

Statistik:

p <

1. Behandlung:

1. 0,005

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

- a) 0,005
- b) -
- c) 0,01

2. Lokalisation:

2. 0,001

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

- a) 0,05
- b) 0,10
- c) 0,10

3. Wechselwirkung:

3. - = -

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

- a)
- b)
- c)

Tab. 5: Beispiel aus dem tabellarischen Anhang (Tab. XXII).
Angabe der Gruppenmittelwerte und in Klammern der
Standardfehler getrennt nach periportal und peri-
venöser Lokalisation. Zur Bedeutung der statistischen
Angaben siehe Text.

Kontr. = Kontrollgruppe, p.H. = 14 Std. nach partieller
Hepatektomie, p.H.+HU = Hydroxyharnstoff (HU)
von der 14.-30. Std. nach partieller Hepatektomie,
P = periportal, V = perivenös.

In den Tabellen sind jeweils die 6 Gruppenmittelwerte und in Klammern die Standardfehler aufgeführt.

Die statistische Berechnung gliedert sich folgendermaßen:

1. Behandlung: Der Anstieg der Oberflächendichte im Verlauf der Experimente läßt sich sowohl im Sammelvergleich ($p < 0,005$) als auch für die beiden Einzelvergleiche gegenüber der Kontrollgruppe (a) $p < 0,005$; c) $p < 0,01$) sichern. Der Abfall der Hydroxyharnstoffgruppe (p.H.+HU) gegenüber der Gruppe "partielle Hepatektomie" (p.H.) (b) -) ist dagegen nicht signifikant.
2. Lokalisation: Die in allen drei Gruppen höheren Werte des perivenösen Bereichs (V) gegenüber dem Periportalbereich (P) werden im Sammelvergleich eindeutig bestätigt ($p < 0,001$). Die Lokalisationsvergleiche innerhalb der Versuchsgruppen ergeben demgegenüber nur für die Kontrollgruppe ein signifikantes Ergebnis auf niedrigem Niveau (a) Kontr.: $p < 0,05$). Unterschiede, die für signifikante Ergebnisse in den Einzelvergleichen zu schwach ausgeprägt sind, können somit durchaus im Sammelvergleich der Varianzanalyse statistisch gesichert werden, wenn die Unterschiede in allen drei Versuchsgruppen gleiche Richtung aufweisen.
3. Wechselwirkung: Der gegenüber den Werten des Periportalbereichs stärkere Anstieg der Oberflächendichte im perivenösen Bereich (Differenzwerte: Perivenöser Bereich minus Periportalbereich: Kontr. = 1,303; p.H. = 2,382; p.H.+HU = 2,425) läßt sich statistisch nicht absichern. Ein bevorzugter Einfluß der Behandlung auf den perivenösen Bereich kann somit aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

3.12.3. Signifikanzschranken

Allgemein wurden die Versuchsergebnisse ab einer Wahrschein-

lichkeit $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen, jedoch wurde in die Tabellen im Anhang auch der Wert $p < 0,10$ aufgenommen, um Grenzbereiche erkennen zu lassen.

Zum Abschluß sei noch erwähnt, daß vor der statistischen Bearbeitung zur besseren Anpassung an eine Normalverteilung bei denjenigen Werten, die "relative Häufigkeiten" darstellen, eine sog. Winkeltransformation (= Arcus-Sinus-Transformation) durchgeführt wurde (Sacks 1972). Um relative Häufigkeiten handelt es sich bei allen Volumendichten, die als Bezugsgrößen wiederum Volumina haben. Die Werte der relativen Häufigkeiten können definitionsgemäß nur zwischen 0 und 1 liegen. Durch die Umformung mit Hilfe der Winkeltransformation wird eine größere Auffächerung dieser Werte erreicht. Nicht betroffen sind hiervon die Oberflächendichten und die numerischen Dichten, ferner nicht die Werte, die auf den Einzelhepatozyten bezogen werden, da es sich bei ihnen um absolute Zahlenwerte handelt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Morphologische Befunde

Kontrollgruppe: Die Lebern der Kontrolltiere entsprechen in ihrem Aufbau den Angaben, wie sie von verschiedenen Autoren ausführlich beschrieben wurden (u.a. Fawcett 1955, Rouiller und Jézéquel 1963, David 1964, Bruni and Porter 1965, Hübner 1968, Tanikawa 1968). Zwischen periportal und perivenös gelegenen Zellen ergeben sich einige Unterschiede, die vor allem beim Vergleich der unmittelbar an die Portalfelder bzw. Zentralvenen angrenzenden Zellagen sichtbar werden.

Die Sinusoide im perivenösen Bereich sind deutlich ausgedehnter und verzweigter. Die Mitochondrien in den periportal gelegenen Zellen erscheinen gegenüber den perivenösen Zellen größer und liefern meist kreisförmige Anschnitte, die in ihrer Größe nicht wesentlich voneinander abweichen. Die Mitochondrien der perivenösen Zellen sind demgegenüber kleiner, etwas zahlreicher und von meist länglicher Gestalt. Das glatte endoplasmatische Retikulum erscheint bei etwa gleichem Glykogengehalt der Zellen im perivenösen Bereich ausgedehnter. In Bezug auf Zellgröße, Zellkern und die übrigen Zellorganellen ergeben sich zwischen periportal und perivenösen Zellen keine eindeutigen Unterschiede (Abb. 11, 12).

14 Std. nach partieller Hepatektomie: 14 Std. nach partieller Hepatektomie zeigt sich lichtmikroskopisch eine Abnahme des Extrahepatozellulärraumes und eine Zunahme der Hepatozytenkerngröße. Elektronenmikroskopisch ist eine Verminderung des Glykogengehaltes auffallend, die zu einem weitgehenden Verschwinden der zuvor ausgedehnten Glykogenareale führt. Beide Läppchenabschnitte zeigen eine Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums mit einer Größenzunahme der Einzelvesikel. Der Golgi-Apparat tritt vor allem in den perivenösen Zellen deut-

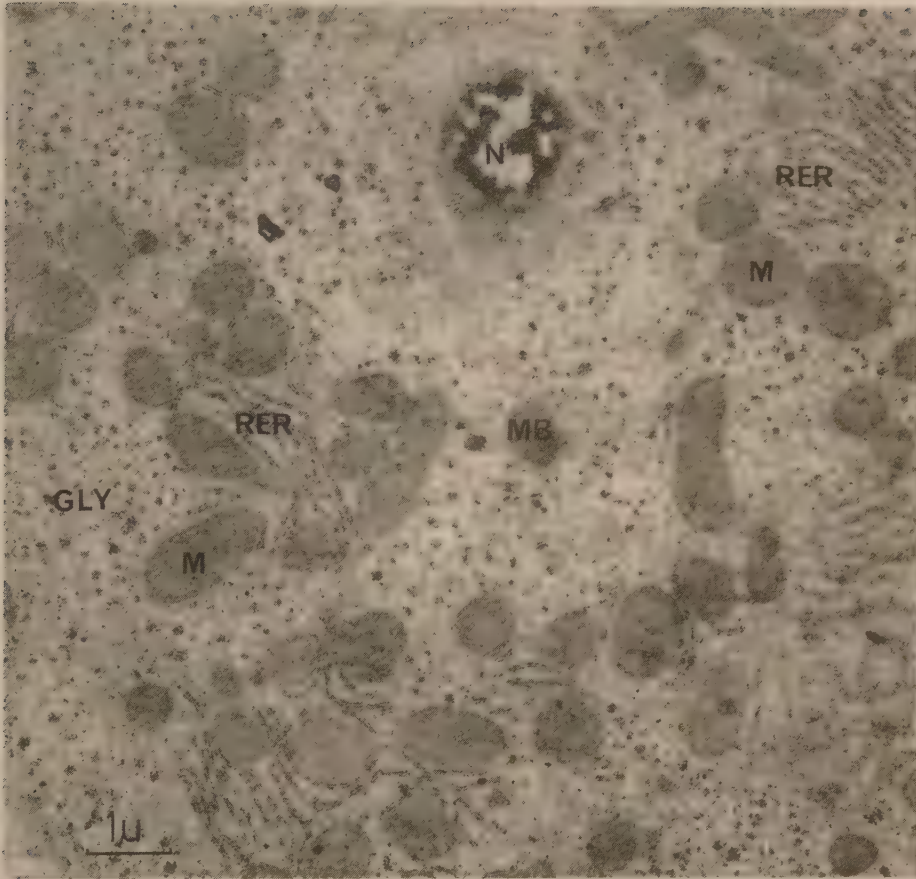


Abb. 11: Kontrollgruppe, Periportalbereich.
Ultrastruktur der Leberparenchymzelle unbehandel-
ter Tiere.

N= Hepatozytennucleus mit Kernporen, M= Mito-
chondrien, MB= Microbodies (Peroxisomen), RER=
rauhes endoplasmatisches Retikulum, Gly= Glyko-
gen.

Nr. 66/27

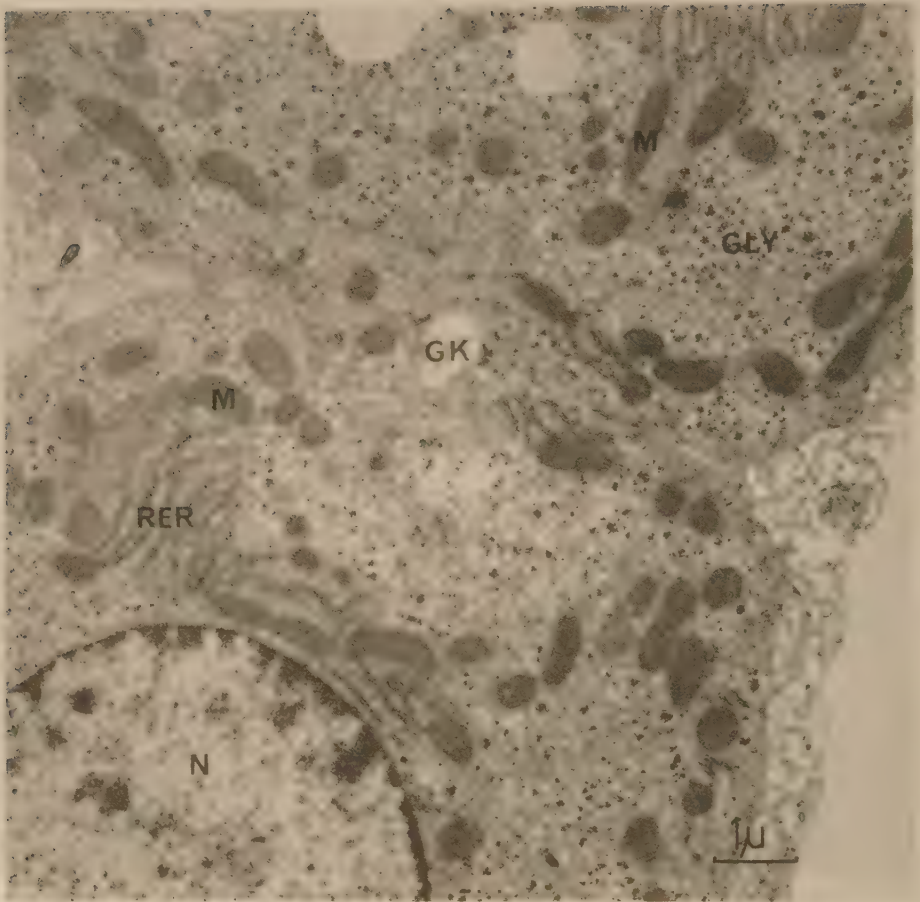


Abb. 12: Kontrollgruppe, perivenöser Bereich.
Zwei benachbarte Hepatozyten mit angeschnittener
Gallenkapillare (GK). Die Mitochondrien des peri-
venösen Bereichs erscheinen etwas kleiner als im
Periportalbereich und sind von länglicher Gestalt.
In beiden Lobulusabschnitten ist reichlich Glyko-
gen vorhanden.
Nr. 67/12

licher in Erscheinung. Der Aufbau des rauhen endoplasmatischen Retikulums ist im wesentlichen unverändert, abgesehen von einer geringen Dilatation der Zisternen in ihren Randbereichen. Der Übergang des rauhen in das glatte endoplasmatische Retikulum erscheint gegenüber den Kontrolltieren nicht mehr so klar abgegrenzt. Die Zahl der Microbodies (Peroxisomen) und der Lysosomen ist in beiden Läppchenabschnitten deutlich vermehrt. Die einsetzende Verfettung der Hepatozyten zeigt sich in Form von klein- bis mittelgroßen Fetttropfen bevorzugt in Zellen des Periportalbereiches. Die Mitochondrien erscheinen vor allem in den periportal Zellen geringgradig geschwollen und erweisen sich nun auch hier von einer größeren Polymorphie (Abb. 13, 14).

Hydroxyharnstoff 14. bis 30. Std. nach partieller Hepatektomie: Die Hydroxyharnstoffinfusion nach partieller Hepatektomie führt zu einer weiteren Schwellung der Zellkerne und zu einer vor allem im Periportalbereich bereits lichtmikroskopisch erkennbaren Zunahme der Zahl und Größe der Fetttropfen. Der Grad der Verfettung ist in den einzelnen Zellen sehr unterschiedlich ausgeprägt. Elektronenoptisch lassen sich Glykogenpartikel wieder vermehrt nachweisen. Das glatte endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat zeigen eine weitere Zunahme im perivenösen Bereich. Das rauhe endoplasmatische Retikulum erscheint morphologisch nicht wesentlich verändert, ebenso zeigt die Gesamtzahl der Ribosomen keine eindeutigen Veränderungen. Die Zahl der Lysosomen bleibt gegenüber den partiell hepatektomierten Tieren konstant, die Zahl und das Volumen der Microbodies ist weiter im Ansteigen begriffen. Die Größe der Mitochondrienanschnitte bleibt in beiden Läppchenabschnitten nahezu unverändert, es treten jedoch vermehrt schüsselförmige, uhrglasförmige oder z.T. bizarr geformte Mitochondrien in Erscheinung. (Abb. 15, 16)

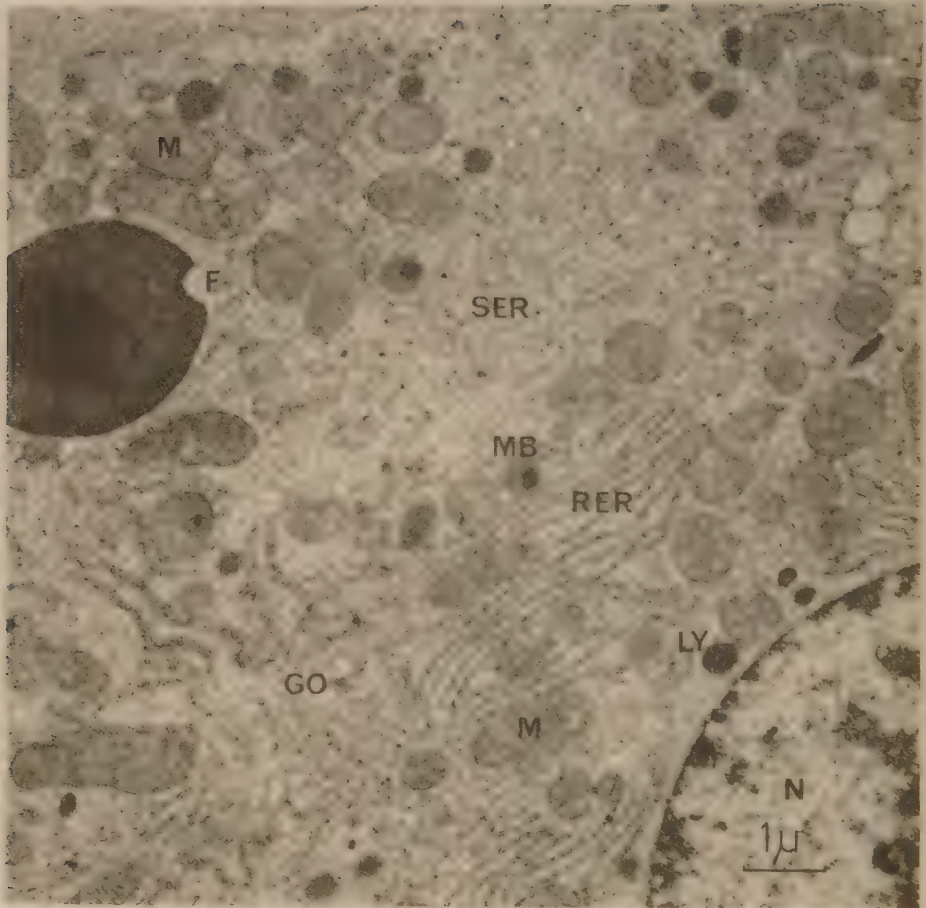


Abb. 13: 14 Std. nach partieller Hepatektomie, Periportalbereich.
Es findet sich eine Schwellung der Mitochondrien, eine deutliche Verminderung des Glykogengehalts und ein vermehrtes Auftreten von glattem endoplasmatischem Retikulum, Microbodies und Fettropfen. N= Hepatozytennucleus, M= Mitochondrien, MB= Microbodies, LY= Lysosomen, F= Fett, RER= rauhes endoplasmatisches Retikulum, SER= glattes endoplasmatisches Retikulum, GO= Golgifeld.
Nr. 22/6

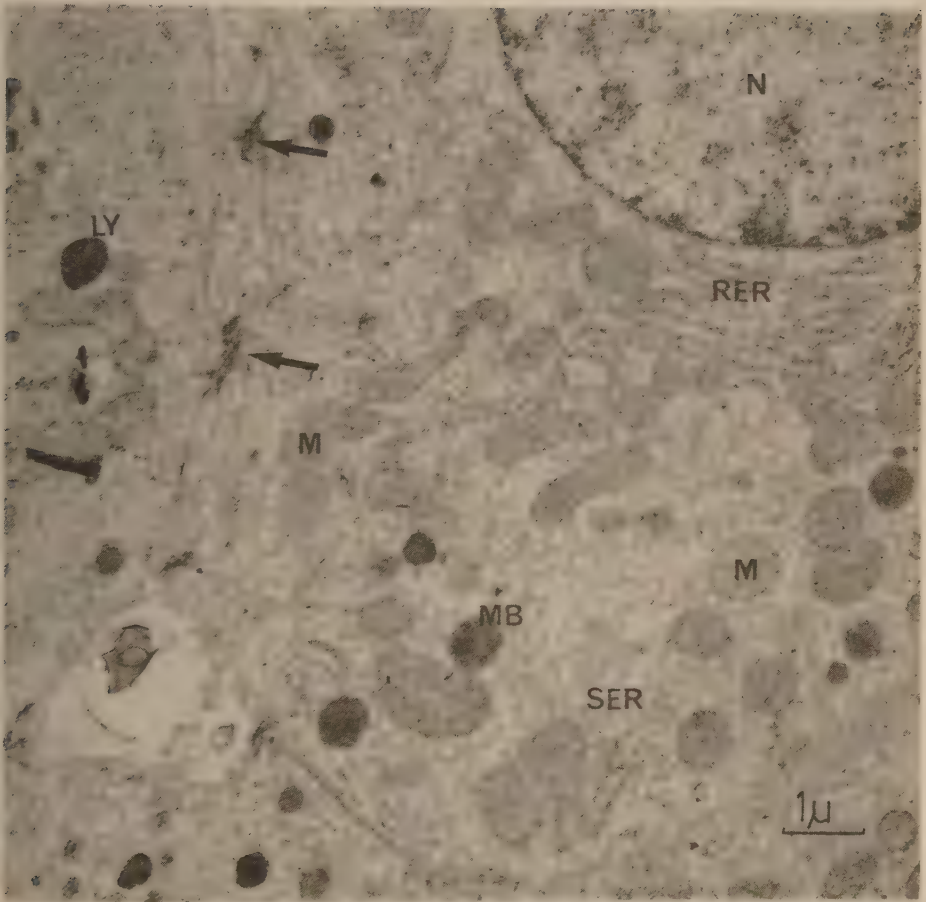


Abb. 14: 14 Std. nach partieller Hepatektomie, perivenöser Bereich.
Anschnitt dreier aneinandergrenzender Hepatozyten mit Haftkomplexen (Pfeil). Auch im perivenösen Bereich findet sich ein weitgehender Schwund des Glykogens mit Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums und des Golgifeldes.
Nr. 20/6

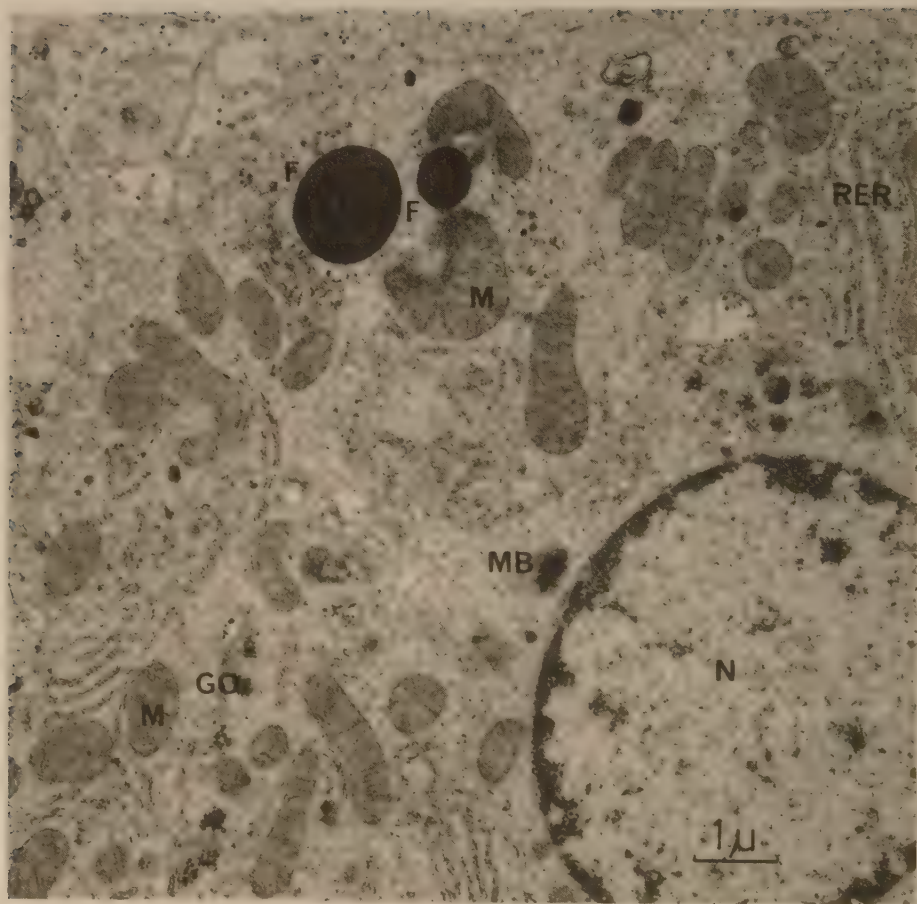


Abb. 15: Hydroxyharnstoff 14.-30. Std. nach partieller Hepatektomie, Periportalbereich.
Weitere Schwellung der Mitochondrien mit verstärkter Polymorphie. Zunahme der Verfettung, die jedoch in den einzelnen Zellen sehr unterschiedlich ausgeprägt ist.
N= Hepatozytenucleus, M= Mitochondrien, MB= Microbodies, F= Fett, RER= rauhes endoplasmatisches Retikulum, GO= Golgifeld.
Nr. 24/14

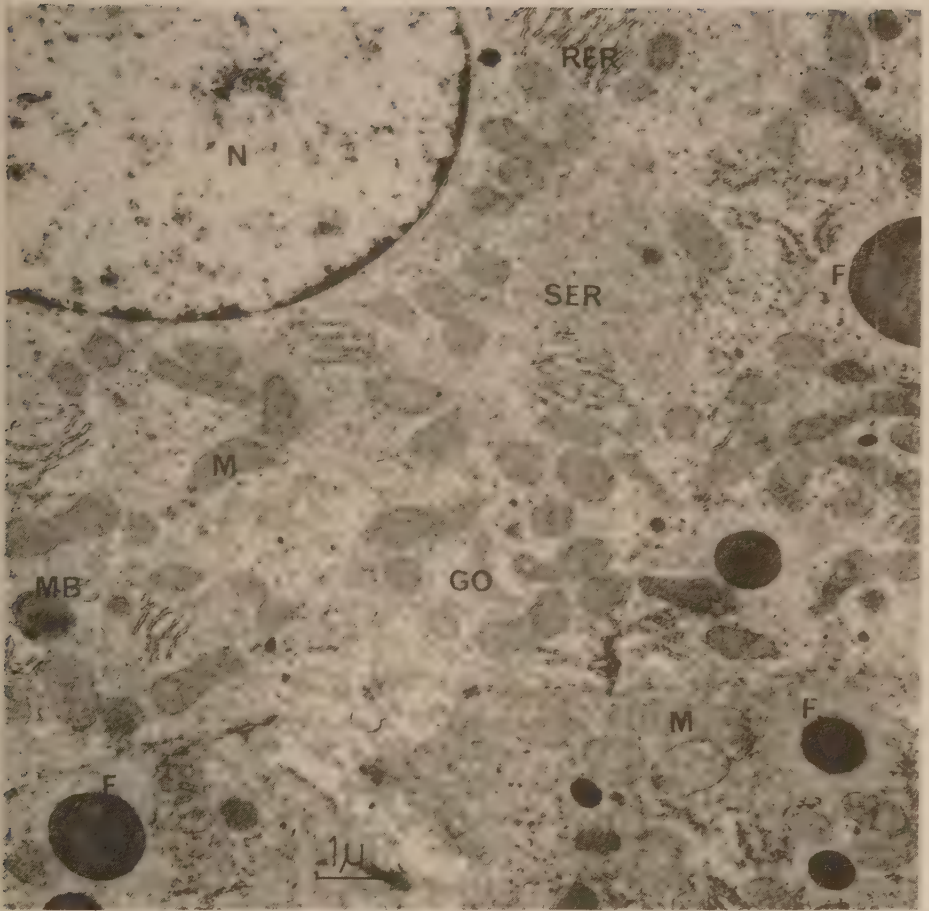


Abb. 16: Hydroxyharnstoff 14.-30. Std. nach partieller
Hepatektomie, perivenöser Bereich.
Deutliche Zunahme des glatten endoplasmatischen
Retikulums. Nun auch im perivenösen Bereich ver-
mehrtes Auftreten von Fettropfen.
Nr. 34/14

4.2. Morphometrische Ergebnisse

Die Ergebnisse der morphometrischen Auswertung sind in den Tabellen 6-8 und im tabellarischen Anhang in den Tabellen I - XXIII zusammengefaßt.

Lichtmikroskopische Ergebnisse:

Die Volumendichte des Extrahepatozellulärtraumes beträgt 15,2% im periportalen bzw. 18,7% im perivenösen Bereich. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,025$). Der Anteil des Extrahepatozellulärtraumes am Lebergewebe nimmt in beiden experimentellen Gruppen in etwa gleichartig um ca. 20-35% ab, wobei die Verteilung zugunsten des perivenösen Bereiches erhalten bleibt.

Spiegelbildlich hierzu findet sich eine Zunahme des Hepatozytenvolumens von 84,8% (P; Kontr.) bzw. 81,4% (V; Kontr.) über 88,1% (P; p.H.) bzw. 87,7% (V; p.H.) ($p < 0,05$) auf 88,4% (P; p.H.+HU) bzw. 85,5% (V; p.H.+HU) ($p < 0,10$). Der in allen drei Versuchsgruppen größere Anteil der Hepatozyten im periportalen Bereich ist statistisch signifikant ($p < 0,005$). Ähnliche Veränderungen ergeben sich bei der Volumendichte des Hepatocytencytoplasmas, während die Volumenschwankungen der Hepatocytenkerne pro Einheitsvolumen Lebergewebe trotz leichter Zunahme statistisch nicht zu sichern sind. Die im Prinzip gleichartigen Veränderungen des Cytoplasma- und Kernvolumens lassen sich an der Kern-Plasma-Relation erkennen, die bei der Kontrollgruppe 1 : 19,9 (P) bzw. 1 : 18,5 (V) beträgt und in beiden Versuchsgruppen im wesentlichen konstant bleibt (Tab. VI).

Eine deutliche Verminderung zeigt sich bei der Zahl der Hepatozytenuclei pro cm^3 Lebergewebe. Bei einem Überwiegen der Kernzahl im perivenösen Bereich ($p < 0,005$) nimmt im Periportalfeld die Kernzahl stetig ab ($136,4 \times 10^6$ (Kontr.), $110,7 \times 10^6$ (p.H.), $85,4 \times 10^6$ (p.H.+HU)), im perivenösen Bereich hingegen bleibt sie zunächst konstant ($148,0 \times 10^6$ (Kontr.), $148,2 \times 10^6$ (p.H.)), um dann eben-

Tab. 6: Werte pro Einheitvolumen (1 cm^3) Lebergewebe

PARAMETER	SYMBOL	DIM.	LOKAL.	Kontr.	p.H.	p.H.+HU
Extrahepatocellulärarraum						
Volumen	V_{VEX}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,152§	0,119	0,116
			V	0,187§	0,123	0,145
Hepatozyten						
Volumen	V_{VH}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,848§	0,881 ⁺	0,884
			V	0,814§	0,877 ⁺	0,855
Cytoplasma						
Volumen	V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,806§	0,830 ⁺	0,838
			V	0,771§	0,830 ⁺	0,811
Hepatocytennuclei						
Volumen	V_{VN}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,041	0,051	0,046
			V	0,043	0,047	0,044
Zahl	N_{VN}	$\frac{\text{cm}^0}{\text{cm}^3} \times 10^6$	P	136,4	110,7§	85,4 ⁺ *
			V	148,0	148,2§	109,3 ⁺ *

§ = signifikanter Unterschied zwischen periportalem und perivenösem Bereich innerhalb einer Gruppe
+ = signifikanter Unterschied zwischen der p.H.- bzw. der p.H.+HU- Gruppe und der Kontrollgruppe
* = signifikanter Unterschied zwischen der p.H.+HU-Gruppe und der p.H.-Gruppe (Signifikanzschranken $p < 0,05$)
Kontr. = Kontrollgruppe, p.H. = 14 Std. nach partieller Hepatektomie, p.H.+HU = Hydroxyharnstoff (HU) von der 14.-30. Std. nach partieller Hepatektomie.

Tab. 6 Forts.: Werte pro Einheitsvolumen (1 cm^3) Lebergewebe

PARAMETER	SYMBOL	DIM.	LOKAL.	Kontr.	p.H.	p.H. +HU
Mitochondrien						
Volumen	V_{VM}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,125	0,142§	0,131§
			V	0,099	0,119§	0,109§
Mitoch. Außenmembran						
Fläche	S_{VMO}	$\frac{\text{m}^2}{\text{cm}^3}$	P	1,343	1,608	1,315
			V	1,184	1,225	1,336
Mitoch. Innenmembran						
Fläche	S_{VMC}	$\frac{\text{m}^2}{\text{cm}^3}$	P	5,057	4,766§	3,607
			V	3,921	2,936§	3,683
Microbodies						
Volumen	V_{VMB}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,003	0,003 ⁺	0,008 ⁺
			V	0,005	0,009 ⁺	0,012 ⁺
Zahl	N_{VMB}	$\frac{\text{cm}^0}{\text{cm}^3} \times 10^9$	P	23,0	64,1 ⁺	50,9 ⁺
			V	32,2	59,6 ⁺	60,5 ⁺
Lysosomen						
Volumen	V_{VLY}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,002	0,004 ⁺	0,003 ⁺
			V	0,002	0,003 ⁺	0,003 ⁺
Fett						
Volumen	V_{VF}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,000	0,025 ⁺	0,101§ ⁺
			V	0,002	0,008 ⁺	0,031§ ⁺

Tab. 6 Forts.: Werte pro Einheitsvolumen (1 cm^3) Lebergewebe

PARAMETER	SYMBOL	DIM.	LOKAL.	Kontr.	p.H.	p.H.+HU
Cytoplasm.						
Grundsubstanz						
Volumen	V_{VGS}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,519	$0,447^{\$}$	0,438
			V	0,503	$0,507^{\$}$	0,471
Rauhes endoplasm.						
Retikulum						
Volumen	V_{VRER}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,035	0,034	0,036
			V	0,028	0,039	0,036
Fläche	S_{VRER}	$\frac{\text{m}^2}{\text{cm}^3}$	P	2,018	2,439	2,064
			V	1,673	2,544	2,049
Glattes endoplasm.						
Retikulum						
Volumen	V_{VSEER}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,056	$0,105^+$	$0,074^{\$}$
			V	0,088	$0,132^+$	$0,123^{\$}$
Fläche	S_{VSEER}	$\frac{\text{m}^2}{\text{cm}^3}$	P	$2,139^{\$}$	$4,151^+$	$3,709^+$
			V	$3,442^{\$}$	$6,533^+$	$6,134^+$
Ribosomen						
Zahl	N_{VRIBO}	$\frac{\text{cm}^0}{\text{cm}^3} \times 10^{15}$	P	0,588	0,541	0,519
			V	0,445	0,595	0,484

Tab. 7: Werte pro Einheitsvolumen (1 cm³) Hepatocytencytoplasma

PARAMETER	SYMBOL	DIM.	LOKAL.	Kontr.	p.H.	p.H. +HU
Mitochondrien						
Volumen	V_{VM}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P V	0,155 0,128	0,171 ^{\$} 0,143 ^{\$}	0,156 ^{\$} 0,134 ^{\$}
Mitoch. Außenmembran						
Fläche	S_{VMO}/V_{VCYT}	$\frac{\text{m}^2}{\text{cm}^3}$	P V	1,662 1,535	1,940 1,475	1,574 1,645
Mitoch. Innenmembran						
Fläche	S_{VMC}/V_{VCYT}	$\frac{\text{m}^2}{\text{cm}^3}$	P V	6,259 5,081	5,752 ^{\$} 3,529 ^{\$}	4,303 4,549
Microbodies						
Volumen	V_{VMB}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P V	0,004 0,006	0,010 ⁺ 0,011 ⁺	0,010 ⁺ 0,015 ⁺
Zahl	N_{VMB}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^0}{\text{cm}^3} \times 10^9$	P V	28,4 41,7	77,0 ⁺ 71,6 ⁺	60,8 ⁺ 74,5 ⁺
Lysosomen						
Volumen	V_{VLY}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P V	0,002 0,002	0,005 ⁺ 0,004 ⁺	0,003 ⁺ 0,004 ⁺
Fett						
Volumen	V_{VF}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P V	0,000 0,002	0,030 ⁺ 0,010 ⁺	0,120 ^{\$+} 0,039 ^{\$+}

Tab. 7 Forts.: Werte pro Einheitsvolumen (1 cm^3) Hepatozytencytoplasma

PARAMETER	SYMBOL	DIM.	LOKAL.	Kontr.	p.H.	p.H.+HU
Cytoplasm.						
Grundsubstanz						
Volumen	V_{VGS}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,645	0,539 $\frac{\text{S}}{\text{S}}$	0,523 $\frac{\text{S}}{\text{S}}$ +
			V	0,653	0,610 $\frac{\text{S}}{\text{S}}$	0,581 $\frac{\text{S}}{\text{S}}$ +
Rauhes endoplasm.						
Retikulum						
Volumen	V_{VRER}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,044	0,041	0,043
			V	0,036	0,047	0,044
Fläche	S_{VRER}/V_{VCYT}	$\frac{\text{m}^2}{\text{cm}^3}$	P	2,499	2,928	2,458
			V	2,160	3,052	2,525
Glattes endoplasm.						
Retikulum						
Volumen	V_{VSER}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	P	0,069	0,127 $^+$	0,088 $\frac{\text{S}}{\text{S}}$
			V	0,115	0,160 $^+$	0,151 $\frac{\text{S}}{\text{S}}$
Fläche	S_{VSER}/V_{VCYT}	$\frac{\text{m}^2}{\text{cm}^3}$	P	2,650	5,007 $^+$	4,412 $^+$
			V	4,466	7,900 $^+$	7,566 $^+$
Ribosomen						
Zahl	N_{VRIBO}/V_{VCYT}	$\frac{\text{cm}^0}{\text{cm}^3} \times 10^{15}$	P	0,729	0,654	0,619
			V	0,577	0,715	0,597

Tab. 8: Werte pro Einzelhepatozyt

PARAMETER	SYMBOL	DIM.	LOKAL.	Kontr.	p.H.	p.H.+HU
Hepatozyt						
Volumen	V_{VH}/N_{VH}	μm^3	P	6365	8029 §	10495 ⁺ *
			V	5572	5992 §	8038 ⁺ *
Cytoplasma						
Volumen	V_{VCYT}/N_{VN}	μm^3	P	6055	7562 §	9946 ⁺ *
			V	5279	5674 §	7631 ⁺ *
Hepatocytennuclei						
Volumen	V_{VN}/N_{VN}	μm^3	P	310	466 §	549 ⁺
			V	293	318 §	407 ⁺

Tab. 8 Forts.: Werte pro Einzelhepatozyt

PARAMETER	SYMBOL	DIM.	LOKAL.	Kontr.	p.H.	p.H.+HU
Mitochondrien						
Volumen	V_{VM}/N_{VN}	μm^3	P V	926 677	1301§ 808§	1552§ ⁺ 1021§ ⁺
Mitoch. Außenmembran						
Fläche	S_{VMO}/N_{VN}	μm^2	P V	9900 8102	14563§ 8415§	15426§ ⁺ 12558§ ⁺
Mitoch. Innenmembran						
Fläche	S_{VMC}/N_{VN}	μm^2	P V	37265 26886	43270§ 20257§	42634 34550
Microbodies						
Volumen	V_{VMB}/N_{VN}	μm^3	P V	25 32	72 ⁺ 61 ⁺	99 ⁺ 112 ⁺
Zahl	N_{VMB}/N_{VN}	cm ⁰	P V	167 223	594 ⁺ 411 ⁺	611 ⁺ 568 ⁺
Lysosomen						
Volumen	V_{VLY}/N_{VN}	μm^3	P V	13 11	34 ⁺ 22 ⁺	32 ⁺ 29 ⁺
Fett						
Volumen	V_{VF}/N_{VN}	μm^3	P V	2 11	221 60	1192§ ⁺ 287§ ⁺

Tab. 8 Forts.: Werte pro Einzelhepatozyt

PARAMETER	SYMBOL	DIM.	LOKAL.	Kontr.	p.H.	p.H.+HU
Cytoplasma.						
Grundsubstanz						
Volumen	V_{VGS}/N_{VN}	μm^3	P	3933	4077	5212
			V	3443	3461	4481
Rauhes endoplasm.						
Retikulum						
Volumen	V_{VRER}/N_{VN}	μm^3	P	261	314	426
			V	196	274	325
Fläche	S_{VRER}/N_{VN}	μm^2	P	15191	22635	23976
			V	11958	17655	18975
Glatte endoplasm.						
Retikulum						
Volumen	V_{VSER}/N_{VN}	μm^3	P	411	957 ⁺	891 ⁺
			V	600	892 ⁺	1153 ⁺
Fläche	S_{VSER}/N_{VN}	μm^2	P	15989	37751 ⁺	45071 ⁺
			V	23520	43884 ⁺	58726 ⁺
Ribosomen						
Zahl	N_{VRIBO}/N_{VN}	$cm^0 \times 10^6$	P	4,468	4,953	6,150\$
			V	3,094	4,108	4,530\$

falls auf $109,3 \times 10^6$ (p.H.+HU) abzufallen. (Abb. 17)

In Kombination mit der Zunahme des Hepatozytenvolumens läßt sich hieraus auf eine Volumenzunahme der Einzelzelle schließen. Die Berechnung des Volumens eines "mononucleären" Hepatozyten ergibt im periportalen Bereich bei einem Ausgangswert von $6365 \mu\text{m}^3$ (P; Kontr.) eine Volumensteigerung um 26,1% (p.H.) bzw. 64,9% (p.H.+HU), im perivenösen Abschnitt wird die Volumenzunahme nur in der HU-Gruppe wirksam ($5572 \mu\text{m}^3$ (Kontr.) bzw. $5992 \mu\text{m}^3$ (p.H.), $8038 \mu\text{m}^3$ (p.H.+HU)). Die Zunahme des Einzelkernvolumens zeigt einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. (Abb. 18, 19)

Elektronenmikroskopische Ergebnisse:

Bei den Mitochondrien findet sich, vor allem bei Bezugnahme auf den Einzelhepatozyten, eine Zunahme sowohl des Mitochondrienvolumens wie auch der mitochondrialen Außenmembran, während die Flächenveränderungen der Cristae uneinheitlich verlaufen (Abb.20-22). In allen Gruppen liegt ein Überwiegen des Periportalbereiches vor. Auf eine Berechnung der Mitochondrienzahl wurde aufgrund der unterschiedlichen Formen der Mitochondrien in den einzelnen Versuchsgruppen und den daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der Berechnung der numerischen Dichte verzichtet. Um dennoch einen Anhalt für die Größe eines einzelnen Mitochondrions zu erhalten, wurde die durchschnittliche Schnittfläche eines einzelnen Mitochondrienanschnittes berechnet, da diese von Formfaktoren unabhängig ist. Bei Ausgangswerten von $0,322 \mu\text{m}^2$ (P, Kontr.) bzw. $0,255 \mu\text{m}^2$ (V, Kontr.) findet sich eine geringe, statistisch nicht zu sichernde Flächenzunahme in beiden Läppchenabschnitten (Tab. X). Die größere Fläche der Mitochondrienanschnitte im Periportalbereich ist in den beiden Versuchsgruppen statistisch signifikant ($p < 0,01$ bzw. $0,025$). Einen weiteren Hinweis auf die Unterschiede der Mitochondrienformen im Leberlobulus liefert die Berechnung der Fläche der mitochondrialen Außenmembran bezogen auf das Mitochondrienvolumen (Tab. XI). Der konstant größere Wert im perivenösen Bereich läßt auf kleinere und/

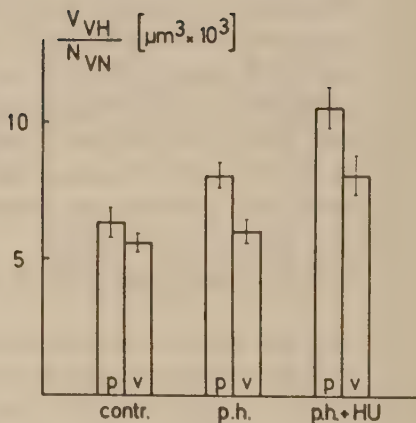
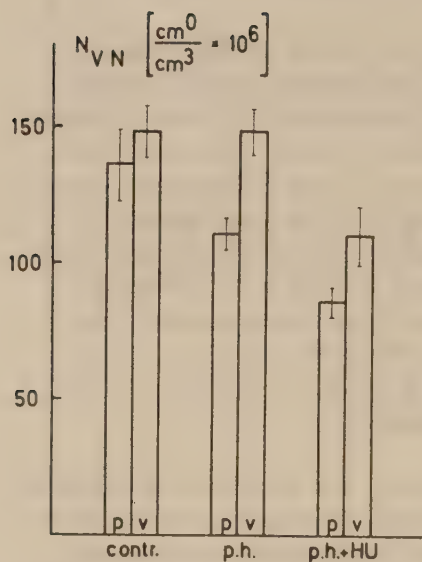


Abb. 17: $N_V N$: Hepatozytenkernzahl in Mill./cm³ Lebergewebe

Abb. 18: V_{VH} / N_{VN} : Hepatozytenvolumen / Einzelhepatozyt

oder länglichere Einzelmitochondrien schließen, die zur Umhüllung eines gleichen Volumens eine größere Oberfläche benötigen. Zwischen den Versuchsgruppen finden sich keine Unterschiede. Die Mitochondrieninnenfläche pro cm³ Mitochondrienvolumen läßt eine geringe Flächenabnahme der Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe erkennen (Tab. XII). Bei nahezu gleichbleibender Cristafläche pro Einzelhepatozyt folgt hieraus eine Mitochondrienvolumenvermehrung ohne begleitende Flächenzunahme der Cristae.

Die Microbodies zeigen in Zahl und Volumen eine Zunahme in

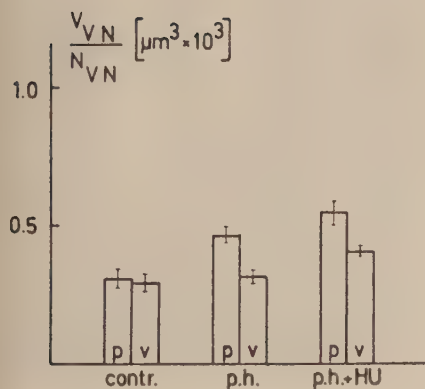


Abb. 19: V_{VN}/N_{VN} : Hepatozytenkernvolumen/Einzelhepatozyt

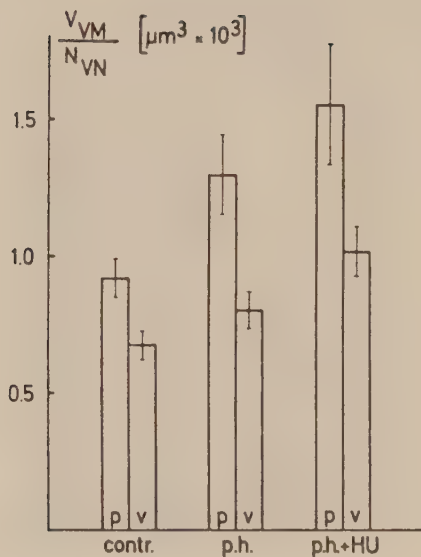


Abb. 20: V_{VM}/N_{VN} : Mitochondrienvolumen/Einzelhepatozyt

beiden Versuchsgruppen um teilweise mehr als das Doppelte (Abb. 23, 24). Das Volumen eines einzelnen Microbodies vergrößert sich in der Hydroxyharnstoffgruppe ebenfalls geringfügig ($p < 0,05$) (Tab. XV).

Eine Volumenzunahme in allen Gruppen findet sich bei den Lysosomen, wobei der Höhepunkt im Periportalbereich in der 14. Std. nach partieller Hepatektomie zu liegen scheint (Abb. 25).

Eine ausgeprägte Volumenzunahme weist der Fettanteil der

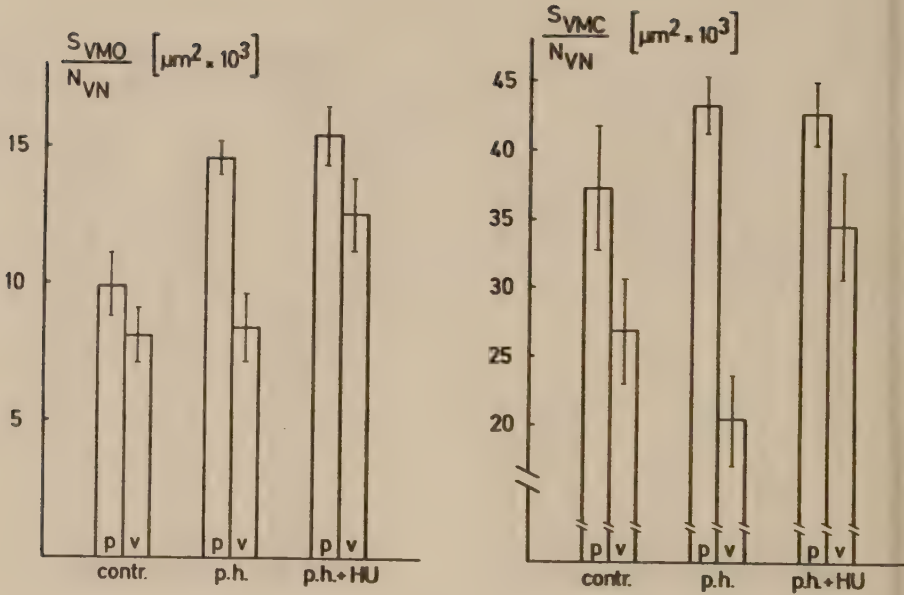


Abb. 21: S_{VMO}/N_{VN} : Oberfläche der mitochondrialen Außenmembran/Einzelhepatozyt

Abb. 22: S_{VMC}/N_{VN} : Oberfläche der mitochondrialen Innenmembran/Einzelhepatozyt

Hepatozyten auf. Von vernachlässigbar geringen Mengen bei den Kontrollen steigt er auf 3,0% (P) bzw. 1,0% (V) des Cytoplasmas in der p.H.-Gruppe, um sich in der Hydroxyharnstoffgruppe auf 12,0% (P) bzw. 3,9% (V) ($p < 0,001$) weiter zu erhöhen. Auffallend ist die deutliche Bevorzugung des periportalen Bereichs, die sich auch bei der Berechnung des Fettanteils pro Einzelhepatozyt bestätigt (Abb. 26).

Das raue endoplasmatische Retikulum weist trotz gewisser

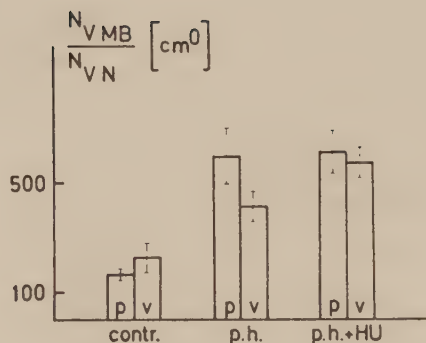
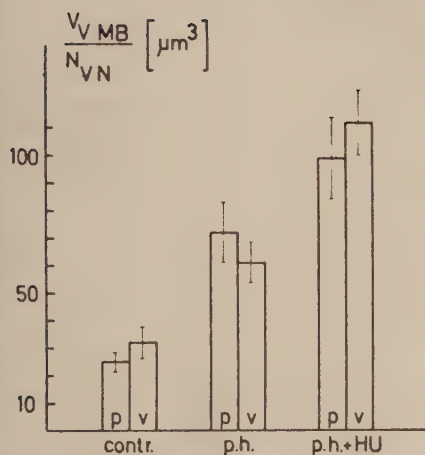


Abb. 23: V_{VMB}/N_{VN} : Volumen der Microbodies/Einzelhepatozyt

Abb. 24: N_{VMB}/N_{VN} : Zahl der Microbodies/Einzelhepatozyt

morphologischer Unterschiede pro cm^3 Cytoplasma keine signifikanten Veränderungen in Volumen und Oberfläche auf. Bei Bezugnahme auf den Einzelhepatozyten ergibt sich eine ca. 60%ige Zunahme für Volumen und Oberfläche in beiden Lobulusabschnitten (Abb. 30, 32).

Das glatte endoplasmatische Retikulum zeigt ebenfalls eine Zunahme von Volumen und Oberfläche in beiden Läppchenabschnitten (Abb. 29, 31). Die Bevorzugung der perivenösen Bereiche läßt sich für die Berechnung pro Einheitsvolumen

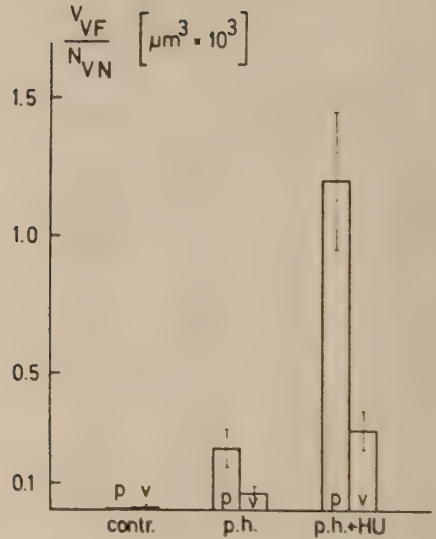
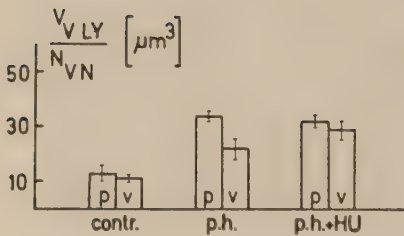


Abb. 25: V_{VLY} / N_{VN} : Volumen der Lysosomen/Einzelhepatozyt

Abb. 26: V_{VF} / N_{VN} : Fettvolumen/Einzelhepatozyt

Cytoplasma statistisch bestätigen ($p < 0,001$).

Die Zahl der Ribosomen pro cm^3 Cytoplasma bleibt im Verlauf der Experimente annähernd konstant, der Anstieg der Ribosomenzahl pro Einzelzelle bis zu 46% läßt sich aufgrund der großen individuellen Schwankungsbreite statistisch nicht sichern (Abb. 28, Tab. XXIII). Der Ausgangswert beträgt 0,588 (P) bzw. 0,445 (V) $\times 10^{15}$ Ribosomen pro cm^3 Lebergewebe oder 4,5 Mill. (P) bzw. 3,1 Mill. (V) Ribosomen in einer "mononucleären" Leberzelle. Das Verhältnis zwischen

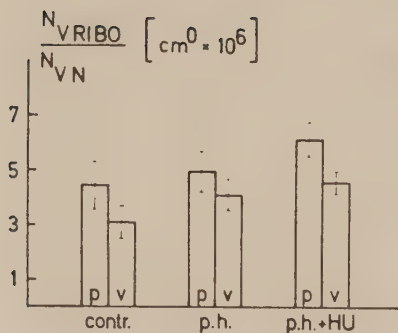
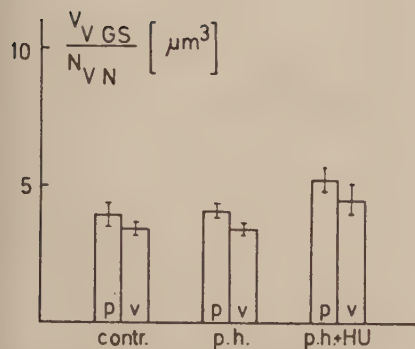


Abb. 27: $\frac{V_{VGS}}{N_{VN}}$: Volumen der cytoplasmatischen Grundsubstanz/Einzelhepatozyt

Abb. 28: $\frac{N_{VRIBO}}{N_{VN}}$: Ribosomenzahl in Mill./Einzelhepatozyt

Ribosomenzahl und Oberfläche des rauhen endoplasmatischen Retikulums läßt keine Unterschiede bezüglich Lokalisation oder Versuchsgruppe erkennen.

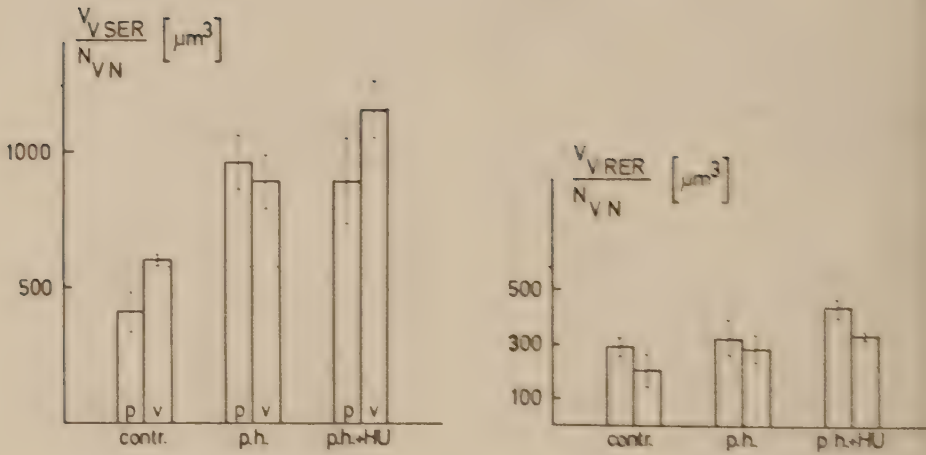


Abb. 29: $\frac{V_{VSER}}{N_{VN}}$: Volumen des glatten endoplasmatischen Retikulums/Einzelhepatozyt

Abb. 30: $\frac{V_{VRER}}{N_{VN}}$: Volumen des rauen endoplasmatischen Retikulums/Einzelhepatozyt

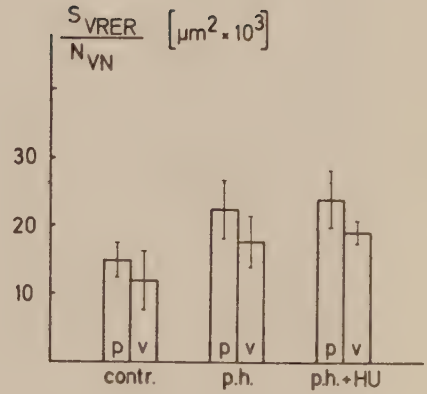
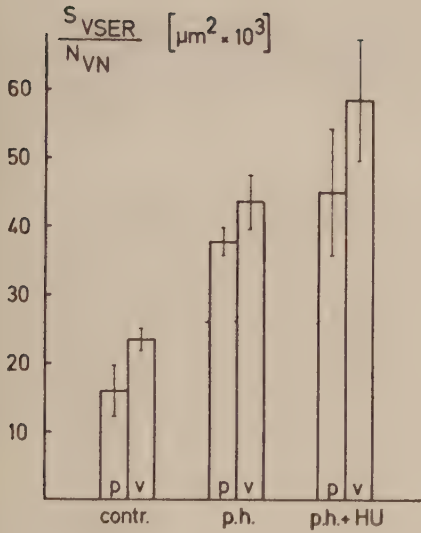


Abb. 31: $\frac{S_{VSER}}{N_{VN}}$: Oberfläche des glatten endoplasmatischen Retikulums/Einzelhepatozyt

Abb. 32: $\frac{S_{VRER}}{N_{VN}}$: Oberfläche des rauhen endoplasmatischen Retikulums/Einzelhepatozyt

5. DISKUSSION

Vor der Besprechung der Untersuchungsergebnisse sollen einige kurze Bemerkungen zum Stellenwert der stereologischen Methoden in der quantitativen mikroskopischen Forschung gemacht werden.

Die stereologischen Formeln zur Bestimmung der Volumen- und Oberflächendichte erscheinen von ihrem mathematischen Ansatz her ausgereift, wenn auch die Suche nach geeigneten Korrekturfaktoren zur Kompensation des Schnittdickeneffektes ("Holmes-Effekt") noch nicht abgeschlossen ist (Weibel and Paumgartner 1978). Insgesamt handelt es sich bei diesen Formeln um die "robustesten Gleichungen der Stereologie" (Weibel 1974), die bei Anwendung einfachster Mittel zuverlässige und aussagekräftige Ergebnisse liefern. Die Bestimmung der numerischen Dichte ist bisher bei biologischen Objekten nur näherungsweise möglich. Die entsprechenden Formeln sind aus diesem Grund nur für geometrisch gut definierbare Strukturen sinnvoll anwendbar. Die Grenzen des stereologischen Verfahrens werden erreicht, wenn Formveränderungen von Strukturen oder bestimmte räumliche Verteilungen wie Polarisierung von Zellen zum Gegenstand der Untersuchung werden. Hier bleibt aufgrund des statistischen Charakters der Stereologie die subjektive Beurteilung durch den Betrachter wohl unersetzlich.

Seit der ausführlichen Darlegung der Grundprinzipien der Stereologie durch verschiedene Autoren Ende der Sechziger Jahre (Weibel und Elias 1967a, De Hoff and Rhines 1968, Underwood 1970) befaßt sich eine immer größere Zahl von Publikationen mit quantitativen Untersuchungen auf der Grundlage stereologischer Beziehungen (Übersichten bei Reith, Barnard und Rohr 1976, David 1977; siehe auch Kongressberichte, z.B. Underwood, de Wit and Moore 1976, Chermant 1978). Es gibt noch gewisse Abweichungen der Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen, die nicht auf unterschiedlichem Alter oder Gewicht der Versuchstiere, Unter-

schieden der Fixationsmethoden (Pilström 1975), der Vergrößerungen (Keller 1976) oder ähnlichem beruhen und somit weiterer Klärung bedürfen (Reith 1977). Insgesamt hat sich jedoch die Stereologie in den letzten Jahren einen festen Platz als Hilfsmittel der quantitativen Morphologie erworben.

5.1. Kontrollgruppe

Ein Vergleich der eigenen Kontrollwerte mit Angaben aus der Literatur ergibt im allgemeinen gute Übereinstimmung der Ergebnisse (Tab. 9). Die Abhängigkeit der Größe des Extrahepatozellulärtraumes von der Art der Fixation zeigt sich in höheren Werten der perfusionsfixierten gegenüber den immersionsfixierten Lebern. Ob die im Vergleich niedrigeren eigenen Werte für die Volumendichten der Zellkerne, Mitochondrien, Lysosomen, Microbodies und des rauhen endoplasmatischen Retikulums Unterschieden der Tierspezies oder unterschiedlichem methodischen Vorgehen zuzuordnen sind, läßt sich nicht eindeutig beantworten. Der beträchtlich höhere Wert der Volumendichte des rauhen endoplasmatischen Retikulums bei Rohr et al. (1976) ist auf eine andere Definition der Areale des rauhen ER, nämlich auf die Erfassung der Zisternen einschließlich des zwischen den Zisternen liegenden Cytoplasmas, zurückzuführen. Die Ergebnisse für die Oberflächendichten sind trotz technisch etwas schwierigerer Erfassung gut vergleichbar. Nur die von Weibel et al. (1969) für das endoplasmatische Retikulum aufgeführten Daten liegen deutlich über den eigenen Werten. Eine kürzlich aus dem gleichen Schweizer Institut erschienene Studie (Bolender et al. 1978), ergab jedoch für die Oberflächendichte des endoplasmatischen Retikulums ebenfalls geringere Werte ($S_{VPER} = 3,20 \text{ m}^2$; $S_{VSER} = 2,84 \text{ m}^2$ pro g Leberparenchym). Die hohen Angaben der früheren Untersuchung wurden auf dickere Gewebeschnitte und stärkere Kompression der Schnitte zurückgeführt.

Aussagen über die Anzahl der Ribosomen finden sich nur in

Parameter	Weibel ^a	Blouin ^b	Rohr ^c	Loud ^d		Eig. Ergebn. ^e	
				P	V	P	V
V_{VEX}	0,129	0,222	0,158	-	-	0,152	0,187
V_{VH}	0,831	0,778	0,842	-	-	0,848	0,814
V_{VN}	0,050	0,076	0,054	-	-	0,041	0,043
$N_{VN} \times 10^6$	169	-	153	154		136	148
V_{VM}/V_{VCYT}	0,235	0,314	0,229	0,198	0,129	0,155	0,128
S_{VMO}/V_{VCYT}	1,89	2,322	1,333	1,513	1,651	1,662	1,535
S_{VMC}/V_{VCYT}	7,63	6,123	4,056	5,750	4,773	6,259	5,081
V_{VLY}/V_{VCYT}	0,009	0,009	0,008	0,003	0,004	0,002	0,002
V_{VMB}/V_{VCYT}	0,015	0,027	0,013	0,014	0,021	0,004	0,006
V_{VF}/V_{VCYT}	-	0,004	-	0,003	0,002	0,000	0,002
V_{VRER}/V_{VCYT}	0,102	-	0,275	-	-	0,044	0,036
S_{VRER}/V_{VCYT}	8,11	4,303	3,271	3,25	3,49	2,499	2,160
V_{VSER}/V_{VCYT}	0,064	-	0,067	-	-	0,069	0,115
S_{VSER}/V_{VCYT}	6,03	3,911	2,974	2,06	2,82	2,650	4,466
$N_{VRIBC} \times 10^{15}$	2,09	-	-	-	-	0,588	0,445

^a Weibel et al.(1969); Fixation: Immersion, Osmiumsäure; Alter: 8-9 Wo.; Gewicht: 163-179g;

^b Blouin et al.(1977); Fixation: Perfusion, Glutaraldehyd; Alter: - ; Gewicht: 214g;

^c Rohr et al. (1976); Fixation: Immersion, Osmiumsäure; Alter: - ; Gewicht: 200-250g;

^d Loud (1968); Fixation: Immersion, Glutaraldehyd; Alter: 20 Wo.; Gewicht: - ;

^e Eigene Ergebnisse; Fixation: Perfusion, Glutaraldehyd; Alter: 7 Wo.; Gewicht: 202-220g;

Tab. 9: Vergleichstabelle mit Angaben aus der Literatur. Die Sekundärparameter der anderen Autoren wurden teilweise aus den angegebenen Primärparametern selbst berechnet. Liste der Abkürzungen und ihrer Dimensionen s. Tab. 6-7.

wenigen morphometrischen Arbeiten. Von Weibel et al. (1969) wurde die Anzahl der Ribosomen mit $334 \text{ pro } \mu\text{m}^2$ rauhen endoplasmatischen Retikulums bestimmt. Über die Oberflächendichte des rauhen ER wurde hieraus die Zahl der membrangebundenen Ribosomen mit $2,09 \times 10^{15} \text{ pro cm}^3$ Lebergewebe berechnet. Dieser Wert beträgt ca. das 4-fache der in der vorliegenden Untersuchung direkt bestimmten Ribosomenzahl von 0,588 (P) bzw. 0,445 (V) $\times 10^{15} \text{ pro cm}^3$ Lebergewebe. Von Blobel and Potter (1967) wird der Anteil membrangebundener Ribosomen mit 75% angegeben. Damit errechnet sich für die vorliegende Untersuchung die Zahl der membrangebundenen Ribosomen zu 219 (P) bzw. 200 (V) $\text{pro } \mu\text{m}^2$ rauhes endoplasmatisches Retikulum. Diese Werte liegen bereits bedeutend näher an den ursprünglichen Angaben Weibels. Eine gewisse Unterschätzung der Ribosomenzahl aufgrund der durch die Fixierung mit Glutaraldehyd dichteren cytoplasmatischen Matrix gegenüber einer Fixierung mit Osmiumsäure kann nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt ist jedoch die weitaus größere Ribosomenzahl Weibels pro cm^3 Lebergewebe vor allem auf seine ca. 3,5-fach größere Oberflächendichte des rauhen ER zurückzuführen.

Eine weitere, ebenfalls indirekte Bestimmung der Ribosomenzahl wurde von Wibo et al. (1971) an Zellfraktionen der Rattenleber durchgeführt. Die morphometrische Untersuchung der Mikrosomenfraktion ergab einen Wert von 240 Ribosomen $\text{pro } \mu\text{m}^2$ "rough membranes", die Hochrechnung auf das gesamte Lebergewebe $0,5 \times 10^{15}$ Ribosomen pro Gramm Leber (Wibo et al. 1973). Damit ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit den eigenen Befunden.

Die Ermittlung der Ribosomenzahl mit Hilfe stereologischer Formeln ist, wie bereits bei der Methodik erwähnt, von verschiedenen Annahmen über Form, Größe und Erkennbarkeit der Ribosomen abhängig. Bei Betrachtung der absoluten Zahlen sind somit systematische Fehler bisher unbekannter Größenordnung zu berücksichtigen, die jedoch bei vergleichenden Untersuchungen dieser Art an Bedeutung verlieren.

Die lokalisationsbedingten Unterschiede der Zellstruktur zeigen sich vor allem bei Betrachtung des Leberzellvolumens, der Mitochondrien und des glatten endoplasmatischen Retikulums. Die im Periportalbereich größere Volumendichte der Hepatozyten steht in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Ausdehnung des Extrahepatozellulärspaces in beiden Läppchenregionen. Jedoch auch die Größe des Einzelzellvolumens, bezogen auf den "mononucleären Hepatozyten", läßt im Periportalbereich größere Einzelzellen erkennen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Louds (1968) Angaben, der bei Messungen des Zelldurchmessers keine Unterschiede bezüglich der Lokalisation feststellen konnte. Das unterschiedliche methodische Vorgehen gestattet jedoch keinen direkten Vergleich der Ergebnisse.

Weitere lokalisationsbedingte Unterschiede finden sich bei der Verteilung der Mitochondrien im Leberlobulus. Die bereits von Loud (1968) und von Reith, Schüler und Vogell (1968) beschriebene größere Volumendichte der Mitochondrien im Periportalbereich wurde zahlenmäßig bestätigt, wenn auch der statistische Einzelvergleich kein signifikantes Ergebnis erbrachte. Trotz der unterschiedlichen Morphologie der Mitochondrien in beiden Läppchenabschnitten lassen sich in ihrem inneren Aufbau keine messbaren Unterschiede erkennen. Die Oberflächendichte der Mitochondrien cristae liefert zwar pro Einheitsvolumen Cytoplasma höhere Werte im Periportalbereich. Dies ist jedoch Folge des größeren Mitochondriengehaltes in den periportal Zellen. Die Oberflächendichte der Cristae bezogen auf die Volumendichte der Mitochondrien ergibt für beide Läppchenabschnitte fast identische Ergebnisse ($29,3 \text{ (P) bzw. } 29,9 \text{ (V) } (\mu^2 / \mu^3)$). Diese Werte befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Angaben Louds von $21,4 \text{ (P) bzw. } 24,2 \text{ (V) } (\mu^2 / \mu^3)$.

Deutliche Unterschiede in Bezug auf die Lokalisation zeigt auch das Verhalten des glatten endoplasmatischen Retikulums. Sowohl für Volumen- als auch für Oberflächendichte finden sich höhere Werte im perivenösen Bereich. Dieser bereits

von Loud (1968) beschriebene Verteilungstyp findet sich auch in den Lebern neugeborener Mäuse (Zotter, Kemmer und Sauer 1971).

5.2. 14 Std. nach partieller Hepatektomie

Die deutlichsten morphometrischen Veränderungen in der 14. Std. nach partieller Hepatektomie stellen die Zunahme der Volumendichte der Lysosomen, der Fettkörper und der Microbodies dar. Unterschiede geringeren Ausmaßes betreffen die Volumenzunahme der Einzelzellen und der Zellkerne, die Zunahme von Volumen und Oberfläche des glatten endoplasmatischen Retikulums und die Volumenzunahme der Mitochondrien. Die übrigen Zellparameter sind im wesentlichen unverändert.

Die früheste morphologisch faßbare Reaktion der Leber auf die partielle Hepatektomie stellt das Auftreten feinsten Lipidgranula im Cytoplasma und im Disseschen Raum nach ca. 30 Minuten dar (Trotter 1965, 1966, Parks 1969). Gleichzeitig beginnt ein Glykogenabbau, der innerhalb von zwei Stunden zu einem völligen Verschwinden des Glykogens im Hepatozyten führt (Bade 1964). Ein Wiederansteigen des Glykogengehaltes kann ab der 20. Stunde nach Operation beobachtet werden (Altmann 1966). Ebenfalls in den ersten Stunden kommt es lichtmikroskopisch zu einer von periportal nach perivenös fortschreitenden Auflösung der basophilen Schollen, der elektronenmikroskopisch ein weitgehender Verlust der geordneten Struktur des rauhen endoplasmatischen Retikulums mit teilweisem Abbau der Membranen entspricht (Bucher 1967, Lane and Becker 1967, Marks et al. 1975). Ab der 9. Stunde erfolgt eine allmähliche Wiederherstellung des rauhen ER, zunächst noch mit dilatierten Zisternen, die ab der 18.-24. Stunde wieder ihre lamelläre Form zurückergangen (Lane and Becker 1967, Marks et al. 1975). Diese zeitlich begrenzte Strukturänderung des rauhen ER mit einem Maximum zwischen der 3. und 9. Stunde nach partieller Hepatektomie läßt sich bei der morphometrischen Auswertung schon in der 14. Stunde nach Operation nicht

mehr sicher nachweisen. Bei Rohr, Strebel und Bianchi (1970) finden sich für die Volumendichte des rauhen endoplasmatischen Retikulums pro cm^3 Hepatozyten Werte von ca. 30% für die Kontrolltiere und ca. 45% für die 12. Std. nach partieller Hepatektomie, gegenüber eigenen Werten von ca. 4,0 bis 4,5% pro cm^3 Cytoplasma für Kontrollgruppe bzw. 14. Std. nach Operation. Diese in etwa zehnfach größeren Angaben sind, wie bereits erwähnt, auf eine andere Definition der Areale des rauhen ER in Rohrs Arbeitsgruppe zurückzuführen, die den Cytoplasmaanteil zwischen den Zisternen des rauhen ER mitberechnet. Unter Zugrundelegung dieser Definition fand Rohr bis zur 24. Std. nach Operation eine kontinuierliche Zunahme der Areale des rauhen ER. Sie scheint jedoch unspezifischer Natur zu sein, da sie bei operierten und scheinoperierten Tieren gleichermaßen erfolgte.

Über das Verhalten der Ribosomen in der Frühphase der Regeneration nach partieller Hepatektomie gibt es in der Literatur unterschiedliche Beobachtungen. Nach David (1967) lösen sich die Ribosomen von den Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums und lagern sich zu noch nach Tagen auffallend vermehrten Polysomen zusammen. Auch Altmann (1966) spricht von einer Vermehrung der freien Ribosomen. Anhand biochemischer Untersuchungen kommen hingegen Majumdar, Tsukada und Liebermann (1967) zu dem Ergebnis, daß nach partieller Hepatektomie kein sicherer Anhalt für eine Zunahme von Zahl und Größe der Polysomen besteht. Die eigenen morphometrischen Resultate zeigen ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen der Ribosomenzahl in der 14. Std. nach partieller Hepatektomie. Es läßt sich allenfalls eine geringe Zunahme im perivenösen Bereich erkennen.

Übereinstimmend beschrieben wird eine Vermehrung der Lyso-somen in den ersten Stunden nach partieller Hepatektomie (Becker and Lane 1965, Altmann 1966, David 1967, Marks et al. 1975), wobei das Maximum in der 6. Std. nach Operation liegt (Rohr, Strebel und Bianchi 1970). Die morphometrische

Auswertung ergibt eine Vergrößerung der Volumendichte der Lysosomen auf ca. das Zweifache, wobei keine Unterschiede bezüglich der Lokalisation zu erkennen sind. Die Zunahme der Volumendichte und der numerischen Dichte der Microbodies steht ebenfalls in Übereinstimmung mit morphologischen Beobachtungen (David 1967, Tanikawa 1968).

Ein weiteres charakteristisches Ereignis ab der 6. Std. nach partieller Hepatektomie stellt eine zunächst fein-, später grobtropfige Verfettung der Hepatozyten dar, die sich von periportal nach perivenös ausbreitet (Jordan 1964, Trotter 1964, Bade 1964). Die Volumendichte des Fettes pro cm^3 Cytoplasma beträgt zur 14. Std. 3,0% (P) bzw. 1,0% (V). Von Rohr, Strebel und Bianchi (1970) werden für die Volumendichte der Fettkörper pro cm^3 Hepatozyten ca. 7,0% in der 12. Std. angegeben. Die deutlich höheren Werte in Rohrs Versuchen sind unter Umständen auf die Gewinnung des Lebergewebes durch wiederholte Biopsien zurückzuführen, welche zu einer verstärkten Traumatisierung und Belastung der Restleber führen könnten.

Von den übrigen Veränderungen seien noch die mäßige Schwellung der Mitochondrien, die von Altmann (1966) als Zeichen für eine Zellschädigung nach partieller Hepatektomie gewertet wird, die Volumen- und Oberflächenzunahme des glatten endoplasmatischen Retikulums und die Volumenzunahme der Einzelzelle und des Zellkerns erwähnt. Die vergrößerten Hepatozyten führen durch ihre Vorwölbung in die Sinusoide zu einer Verformung der normalen Läppchenstruktur (Bucher 1963, 1967) und damit, wie sich morphometrisch zeigt, zu einer Verringerung der Volumendichte des Extrahepatozellulär-raumes im Lebergewebe. Die Vergrößerung der Hepatozyten bis zur 14. Std. nach Operation ereignet sich vorwiegend im Periportalbereich. Dies wird zahlenmäßig erst sichtbar, wenn die durch die Ausdehnung der Zellen hervorgerufene relative Verminderung der Kernzahl pro Einheitsvolumen Lebergewebe mit berücksichtigt wird. Dies geschieht durch die Berechnung des Zellvolumens pro "mononucleärem Hepatozyten". In gleicher Weise ergibt sich bei dieser Art der

Berechnung auch für das Einzelkernvolumen eine deutliche Zunahme von 50,1% im Periportalbereich gegenüber nur 8,5% in den perivenösen Zellen. Die vorwiegend periportale Volumenzunahme der Kerne dürfte im wesentlichen funktionaler Natur sein, da ab der 15. bis 18. Std. ebenfalls in den periportal Zellen der Beginn der DNS-Synthese zu beobachten ist (Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1968, Rabes und Tuczek 1970, Rabes 1976, 1978).

An dieser Stelle erscheint eine kurze Erläuterung zur Darstellung der Zahlenwerte pro "mononucleärem Hepatozyten" angebracht. Das Vorliegen zweikerniger Leberparenchymzellen wird bei diesem Verfahren nicht gesondert berücksichtigt. Von Wheatley (1972) wird der Prozentsatz binucleärer Zellen bei 50 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten mit 40,9% angegeben. Dieser Wert ist altersabhängig und vermindert sich auf ca. 30% bei älteren Tieren. Ferner finden sich Unterschiede zwischen verschiedenen Rattenstämmen. Vergleiche mit anderen Autoren sind auf der Basis des "mononucleären Hepatozyten" deshalb nur bedingt möglich. Jedoch besitzt diese Art der Darstellung den Vorteil, daß sie auf die Zelle als "grundlegende biologische Einheit" (Loud 1968) Bezug nimmt. Nach partieller Hepatektomie bleibt der Prozentsatz binucleärer Zellen bis zur 28. Std. nach Operation konstant (Wheatley 1972). Die anschließende rasche Verminderung des Gehalts an zweikernigen Zellen ist bei ungestörter Regeneration zeitlich mit dem Einsetzen der Mitose verbunden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen mit Hemmung der DNS-Synthese durch Hydroxyharnstoff ist eine Verringerung der Kernzahl auch in der 30. Std. nach Operation noch nicht zu erwarten. Veränderungen der Kernzahl, z.B. durch Zellnekrosen, sind wegen der geringen allgemeinen Toxizität des Hydroxyharnstoffs (Schwartz et al. 1965) und in Anbetracht der vergleichsweise kurzen Versuchsdauer ebenfalls auszuschließen. Die Zahl der Hepatozytenkerne stellt damit für die vorliegenden Versuche ein konstantes Bezugssystem dar, das, wie oben gezeigt, Veränderungen der Zellstruktur unter

Umständen deutlicher widerspiegelt, als dies durch Angaben "pro Einheitsvolumen" erfolgen kann. Sonst übliche Bezugssysteme, wie das Lebergewicht oder das Lebervolumen, waren nicht nur wegen der durchgeführten Perfusionsfixierung weniger geeignet, sie wären auch der gewünschten Differenzierung der Zellen bezüglich ihrer Lokalisation im Leberläppchen nicht gerecht geworden.

5.3. HU 14.-30. Std. nach partieller Hepatektomie

Unter der Gabe von HU kommt es bei proliferierenden Zellen sowohl in Gewebekulturen (Young and Hodas 1964, Pfeiffer and Tolmach 1967, Bosmann 1971, Bhuyan and Fraser 1974) als auch bei der regenerierenden Leber (Schwartz et al. 1965, Yarbrow et al. 1965, Hill and Gordon 1968) trotz weitgehender Hemmung der DNS-Synthese zu einem Fortlaufen der RNS- und Proteinsynthese. Dieses Auftreten einer Dissoziation der makromolekularen Synthesen (Rajewski, Hülser und Fabricius 1971) ist nicht auf die Anwendung von HU beschränkt. Sie wurde von Cohen and Barner (1954) erstmals an *Escherichia coli* unter Thymidinmangel beobachtet und als "unbalanced growth" bezeichnet. Der Zustand des "unbalanced growth" wird von Zellkulturen und Bakterien unterschiedlich lange toleriert und ist für eine gewisse Zeit bei Aufhebung der DNS-Synthesehemmung reversibel, führt letztlich jedoch bei fortgesetzter Blockade der DNS-Synthesehemmung zum Zelltod (Rueckert and Mueller 1960, Lambert and Studzinski 1967, Sinclair 1967, Kim, Gelbard and Perez 1967, Kim, Perez and Djordjevic 1968, Bacchetti and Whitmore 1969, Coyle and Strauss 1970, Bhuyan and Fraser 1974, Ross 1976). Für eine ursächliche Beteiligung der Dissoziation der makromolekularen Synthesen am Zelluntergang spricht die teilweise Reversibilität des Vorgangs bei gleichzeitiger Hemmung der Proteinsynthese (Kim, Perez and Djordjevic 1968, Bhuyan and Fraser 1974). Die regenerierende Leber scheint in geringerem Maße von den proliferationshemmenden Auswirkungen des "unbalanced growth" beeinflusst zu werden. Auch nach einer HU-Gabe über insgesamt 30 Std.

nach partieller Hepatektomie treten nach Aufhebung des HU-Blockes mehr als 80% der Hepatozyten in die DNS-Synthese ein (Rabes et al. 1977).

Über die morphologischen Auswirkungen des "unbalanced growth" unter HU gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Ross (1976) ermittelte für Gewebekulturen von Fibroblasten und Lymphomzellen eine stündliche Volumenzunahme der Zellen von 7,5 bzw. 11,1% des Kontrollvolumens. Ockey and Allen (1975) fanden ebenfalls an Gewebekulturen eine Vergrößerung des Kerndurchmessers. Von Cameron and Jeter (1973) wird bei Tetrahymena 17 Std. nach Gabe von HU eine ca. 3-fache Größenzunahme der Zellen beschrieben. Bei Bakterien schließlich zeigten sich die Auswirkungen des "unbalanced growth" unter HU in einer deutlichen Dickenzunahme der Zellwand (Feiner, Coward and Rosenkranz 1973).

Die vorliegenden morphometrischen Untersuchungen an der regenerierenden Rattenleber nach einer HU-Infusion über insgesamt 16 Std., die zu einer 98%igen Hemmung der DNS-Synthese führt (Rabes et al. 1977), lassen ebenfalls Erscheinungen des "unbalanced growth" erkennen. Es kommt zu einem fortgesetzten Wachstum der Leberparenchymzellen mit einer Zellvolumenzunahme von ca. 30% in beiden Läppchenabschnitten gegenüber den Werten in der 14. Std. nach partieller Hepatektomie. Die Zellvolumenzunahme wird begleitet von einer etwas geringeren Größenzunahme der Zellkerne.

Eine interessante Übereinstimmung ergibt der Vergleich zwischen Volumenzuwachs der Einzelzellen und Gewichtszuwachs der gesamten Leber nach partieller Hepatektomie und Gabe von HU. Einer Volumenzunahme von 30,7% (P) bzw. 34,2% (V) (14. Std. nach partieller Hepatektomie = 100%) steht im gleichen Zeitraum eine Zunahme des Feuchtgewichts von 30,6% und des Trockengewichts von 28,6% gegenüber (Rabes et al. 1977). Dies ist ein Hinweis dafür, daß bei der Volumenzunahme der Hepatozyten von einer echten Substanzvermehrung ausgegangen werden kann.

Von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der periportal-perivenösen Unterschiede ist neben den natürlichen lokalen Differenzen die unterschiedliche Dauer der Blockade der DNS-Synthese in den einzelnen Lobulusabschnitten. Bei ungestörter Regeneration nach partieller Hepatektomie läuft in der Rattenleber das Einsetzen der DNS-Synthese zeitlich gestaffelt ab. Die ersten DNS-synthetisierenden Zellen treten in der 15.-18. Std. nach partieller Hepatektomie in Erscheinung (Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1968, Rabes and Brändle 1969) und befinden sich zu 80% im periportalen Drittel des Leberläppchens (Grisham 1962). Die intermediären Zellen folgen ca. zur 22. Std. nach Operation, während die DNS-Synthesephase der perivenösen Zellen im allgemeinen jenseits der 30. Std. nach partieller Hepatektomie einsetzt (Rabes und Tuczek 1970, Rabes et al. 1976). Die Hepatozyten werden während der HU-Infusion je nach Lokalisation im Lobulus für einen unterschiedlich langen Zeitraum am Übergang der G_1 in die S-Phase akkumuliert. In der 30. Std. nach partieller Hepatektomie liegt die maximale Blockdauer der periportal Zellen bei 15 Std., der intermediären Zellen bei ca. 8 Std., während im perivenösen Bereich im allgemeinen noch keine Hemmung wirksam wird. Den zeitlichen Zusammenhang zwischen partieller Hepatektomie, Zellzyklusphasen und HU-Applikation zeigt in schematischer Form die Abb. 33. Bezüglich der DNS-Synthese befinden sich die perivenösen Zellen der 30. Std. in einem ähnlichen funktionellen Zustand wie die periportal Zellen der 14. Std. nach partieller Hepatektomie. In diesem Sinne lassen sich auch die morphometrischen Ergebnisse z.B. für das Einzelzellvolumen interpretieren. Die periportal Zellen zeigen einen kontinuierlichen Volumenzuwachs (V_{VH}/N_{VN} (P) in μm^3 : 6365 (Kontr.), 8029 (p.H.), 10495 (p.H.+HU)), während die perivenösen Zellen zunächst keine deutliche Reaktion erkennen lassen, um in der 30. Std. nach Operation auf das Niveau der periportal Zellen in der 14. Std. nach partieller Hepatektomie anzusteigen (V_{VH}/N_{VN} (V) in μm^3 : 5572 (Kontr.), 5992 (p.H.), 8038 (p.H.+HU)).

Aus der zeitlichen Abfolge der DNS-Synthese ergibt sich, daß ein Zustand des "unbalanced growth" unter den vorliegenden Versuchsbedingungen entsprechend der biochemischen Definition vor allem für die periportalen Zellen zu erwarten ist, da nur hier die Hemmung der DNS-Synthese voll wirksam wird. Zunahmen der Werte im perivenösen Bereich sind hingegen eher als späte Reaktion auf den Proliferationsstimulus durch die partielle Hepatektomie zu deuten.

Die elektronenmikroskopische Auswertung gestattet, den Volumenzuwachs der Einzelzellen den einzelnen Zellbestandteilen näher zuzuordnen. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der 14. Std. nach partieller Hepatektomie finden sich für die vorwiegend periportale Vermehrung der Fettkörper und für die Zunahme der Volumendichte der Microbodies. Herkunft und Zusammensetzung der Fettkörper sind derzeit ungeklärt, es dürfte sich jedoch im wesentlichen um Triglyceride handeln. Neben der bekannten Zunahme des Fettanteils in den Hepatozyten nach partieller Hepatektomie wird von Trotter (1966) auch auf den Einfluß längeren Hungers bei der Fettakkumulation hingewiesen. Von der Vermehrung der Fettkörper auf eine stärkere Schädigung der Leberzelle zu schließen, erscheint nicht gerechtfertigt, da, wie bereits erwähnt, nach Absetzen des HU-Blockes die überwiegende Mehrzahl der Hepatozyten mit nur kurzer Verzögerung in die DNS-Synthese eintritt (Rabes et al. 1977).

Abb. 33: Zeitlicher Zusammenhang zwischen partieller Hepatektomie, Zellzyklusphasen und HU-Applikation.

G_0 = Phase proliferativer Ruhe

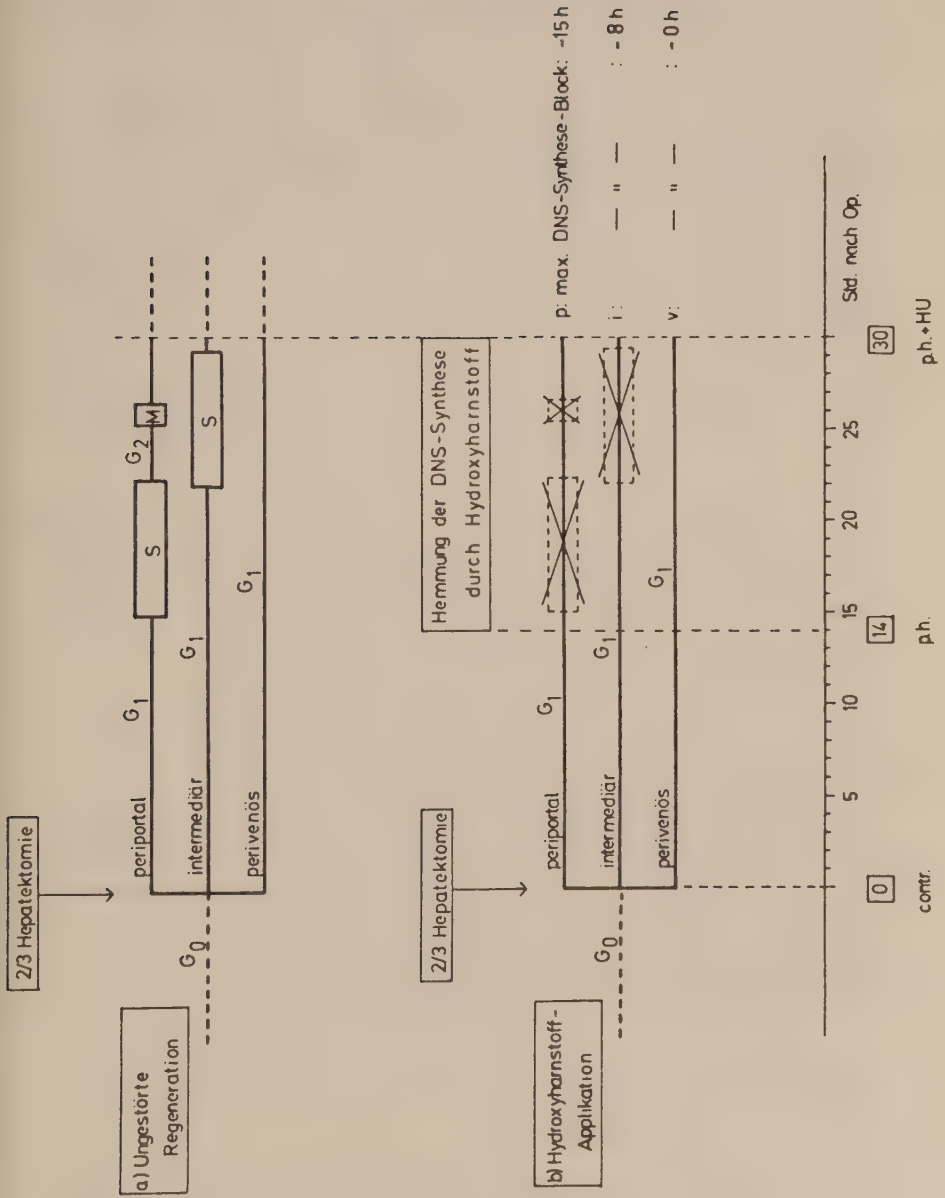
G_1 = präsynthetische Ruhephase

S = DNS-Synthesephase

G_2 = postsynthetische, prämitotische Ruhephase

M = Mitose

Weitere Erklärungen siehe Text.



Von den übrigen Zellbestandteilen mit statistisch nicht signifikanten Ergebnissen ist die Ausdehnung der cytoplasmatischen Grundsubstanz etwa zur Hälfte an der Volumenvermehrung der Einzelzellen beteiligt. Wird die Volumenzunahme der Einzelzelle im periportal und perivenösen Bereich zu je 100% angesetzt, so beträgt der Anteil der Vermehrung der cytoplasmatischen Grundsubstanz hieran 46,0% (P) bzw. 49,9% (V), der Anteil der Fettkörpervermehrung 39,4% (P) bzw. 11,1% (V), während die Zunahme der Volumendichte der Microbodies, obwohl in sich statistisch signifikant, nur mit 1,1% (P) bzw. 2,5% (V) an der Gesamtvolumenvermehrung beteiligt ist (Tab. 10).

Der Anteil der Mitochondrien an der Zellvolumenzunahme beträgt 10,2% (P) bzw. 10,4% (V), die Oberflächendichten der mitochondrialen Außenmembran und der Cristae erfahren im perivenösen Bereich ebenfalls eine Zunahme, die durchschnittliche Anschnittsfläche eines Mitochondrions bleibt hingegen in beiden Lobulusabschnitten konstant. Die gleichbleibende Anschnittsfläche läßt jedoch nicht unbedingt auf eine konstante Größe der Mitochondrien schließen, da durch die verstärkte Polymorphie in der HU-Gruppe ein Mitochondrion auch mehrere Anschnitte zu liefern vermag. Die vergleichsweise mäßigen Veränderungen der Mitochondrien sind unter Umständen durch den geringeren Einfluß des HU auf die mitochondriale gegenüber der nukleären DNS-Synthese zu erklären (Vesco and Penman 1969, Baugnet-Mahieu, Goutier and Baes 1971). Für isolierte Rattenlebermitochondrien fand Bosmann (1971) nach Gabe gleicher Dosen HU eine Hemmung der mitochondrialen DNS-Synthese von nur 56% gegenüber 96% Hemmung bei *Escherichia coli* und 97% Hemmung bei Mäuseleukämiezellen. Berliner (1975) konnte sogar nach 2-tägiger Gabe von HU keinen eindeutigen Einfluß auf die Volumendichte, Oberflächendichte und numerische Dichte bei Mitochondrien einer Leberzelllinie feststellen.

Die Veränderungen des rauen endoplasmatischen Retikulums und der Ribosomenzahl nach Gabe von HU lassen eine gewisse Zunahme der Werte erkennen. Für die Volumendichte des rauen

	Volumenzunahme um			
	um ³		%	
	P	V	P	V
Hepatozyt	+2466	+2046	100,0	100,0
Zellkern	+ 83	+ 89	+ 3,4	+ 4,4
Mitochondrien	+ 251	+ 213	+10,2	+10,4
Microbodies	+ 27	+ 51	+ 1,1	+ 2,5
Lysosomen	- 2	+ 7	- 0,1	+ 0,3
Fett	+ 971	+ 227	+39,4	+11,1
Cytopl. Grundsubstanz	+1135	+1020	+46,0	+49,9
Rauhes ER	+ 112	+ 51	+ 4,5	+ 2,5
Glattes ER	+ 66	+ 261	- 2,7	+12,8

Tab. 10: Aufgliederung der Volumenzunahme der Einzelhepatozyten von der 14. Std. nach partieller Hepatektomie (p.H.) bis zur 30. Std. nach Operation (p.H.+HU). Die absoluten Volumenänderungen der Zelle und ihrer Bestandteile sind in μm^3 angegeben, die Prozentangaben sind auf die Volumenzunahme der Einzelzelle gleich 100% bezogen.

Die Abweichungen der Summe der Einzelwerte von 100% sind durch die Bestimmung der Parameter in drei verschiedenen Vergrößerungsstufen und die hierdurch auftretenden, sich überlappenden Stichprobenfehler zu erklären. Die Parameter selbst wurden jeweils einzeln und ohne Differenzbildung ermittelt. Der Stichprobenfehler ist in der 3. Vergrößerungsstufe (71450 fach) aufgrund des kleinen Gesichtsfeldes am größten. Die Abweichungen der Werte von der Gesamtsumme werden somit vor allem den in dieser Stufe bestimmten Parametern (cytoplasmatische Grundsubstanz, rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum) zuzuordnen sein. Siehe hierzu auch Kap. 3.11.3..

endoplasmatischen Retikulums findet sich gegenüber der 14. Std. nach partieller Hepatektomie eine Volumenvermehrung von 35,7% (P) bzw. 18,6% (V), entsprechend einem Anteil an der Volumenzunahme der Einzelzelle von 4,5% (P) bzw. 2,5% (V), während die Oberflächendichte nur eine geringe Steigerung um 5,9% (P) bzw. 7,5% (V) erfährt. Die Zahl der Ribosomen nimmt um 24,2% (P) bzw. 10,3% (V) zu.

Einen Hinweis auf den funktionellen Aktivitätszustand des nach morphometrischen Kriterien leicht vergrößerten rauen endoplasmatischen Retikulums liefert ein Vergleich mit biochemischen Resultaten. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, findet sich unter HU von der 15. bis zur 32. Std. nach partieller Hepatektomie pro g Feuchtleber eine Steigerung des RNS-Gehaltes von 6,8 auf 9,1 mg. Durch die gleichzeitige Zunahme des Lebergewichtes um ein Drittel beträgt die Steigerung des gesamten RNS-Gehaltes in der Restleber über diesen Zeitraum 75%. Der Proteingehalt erhöht sich um 10% pro g Feuchtleber bzw. um 44% pro gesamte Restleber (Rabes und Czichos, unveröffentlichte Ergebnisse).

In einem weiteren Versuch wurde zur Bestimmung der RNS-Syntheserate C^{14} -markierte Orotsäure gegeben, die als Baustein der Pyrimidinnucleoside zu einer Markierung neusynthetisierter RNS führt. Es fand sich über den gleichen Versuchszeitraum ein Abfall der spezifischen Aktivität von Uridintriphosphat (UTP) und RNS von 52% bzw. 48% (Rabes und Czichos, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Diskrepanz zwischen Zunahme des RNS- und Proteingehaltes und Abnahme der spezifischen Aktivität von UTP und RNS ist möglicherweise durch die Hemmung der Ribonucleosid-Diphosphat-Reduktase durch HU zu erklären. Die blockierte Umwandlung der Ribonucleoside in Desoxyribonucleoside könnte bei ungestörter Neusynthese der Pyrimidinnucleoside zu einer Vergrößerung des Pools an verfügbarem Uridintriphosphat und damit zum Abfall der spezifischen Aktivität des UTPs und infolgedessen auch der RNS unter diesen Versuchsbedingungen führen. Somit scheint in der Bilanz der Nachweis eines ansteigenden

RNS-Gehaltes ein besserer Indikator für die RNS-Syntheseleistung der Leber unter HU zu sein als die Bestimmung der RNS-Syntheserate mit radioaktiv markierten RNS-Präkursoren.

Ein direkter Vergleich zwischen biochemischen und morphometrischen Ergebnissen ist aufgrund der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und Bezugssysteme nur unter Vorbehalt möglich. Dennoch ist ein gemeinsamer Anstieg von RNS- und Proteingehalt einerseits und eine Größenzunahme des rauen endoplasmatischen Retikulums bzw. eine zahlenmäßige Vermehrung der Ribosomen andererseits festzustellen. Die Zunahme der funktionellen Aktivität fällt prozentual jedoch etwas stärker aus als die entsprechenden morphometrischen Veränderungen.

Ein ähnlicher Vergleich biochemischer und morphometrischer Ergebnisse wurde für das glatte endoplasmatische Retikulum unternommen. Morphometrisch findet sich pro Einzelzelle gegenüber der 14. Std. nach partieller Hepatektomie periportal ein geringer Abfall der Volumendichte von 4,9% (P), perivenös eine Zunahme von 29,3% (V), entsprechend einem Anteil an der Volumenzunahme der Einzelzelle von -2,7% (P) bzw. +12,8% (V). Die Oberflächendichte erfährt eine Vergrößerung um 19,4% (P) bzw. 33,8% (V). Als Maß für den Aktivitätszustand des glatten endoplasmatischen Retikulums wurde eine Bestimmung des Cytochroms P 450 durchgeführt, einer mischfunktionellen Oxidase, die in den Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Remmer 1970). Es fand sich unter den gleichen Versuchsbedingungen von der 15. bis zur 32. Std. nach partieller Hepatektomie unter HU eine Verminderung des Gehalts an Cytochrom P 450 um 16% pro mg microsomales Protein (Rabes, unveröffentlichte Ergebnisse). Es liegen derzeit keine Daten vor, die eine Umrechnung dieses Ergebnisses auf das gesamte Lebergewicht gestatten. Dennoch ist anzunehmen, daß die Volumen- und Oberflächenzunahme des glatten endoplasmatischen Retikulums auch mit einer Vermehrung des

microsomalen Proteins einhergeht, so daß, bezogen auf die gesamte Restleber, die funktionelle Aktivität des glatten endoplasmatischen Retikulums gegenüber der 14. Std. nach partieller Hepatektomie erhalten oder sogar gering gesteigert sein dürfte. Die morphometrischen Ergebnisse deuten auf eine leichte Bevorzugung der perivenösen Läppchenabschnitte auch unter diesen Bedingungen hin.

Zusammenfassend ergibt sich nach partieller Hepatektomie und Gabe von HU bei einigen Zellparametern eine Volumenzunahme, die in ihrer Entwicklung parallel zur DNS-Synthese-Hemmung durch HU verläuft. Sie ist gekennzeichnet durch den kontinuierlichen Anstieg der Werte im Periportalbereich und eine verzögerte Zunahme der Werte im perivenösen Bereich. Die Werte der perivenösen Zellen in der 30. Std. nach Operation erreichen hierbei in etwa nur das Niveau der Werte der periportalen Zellen in der 14. Std. nach Operation. Diese Reaktionsweise ist deutlich ausgeprägt bei der Zunahme des Einzelzellvolumens, läßt sich in ähnlicher Form aber auch bei den Volumendichten der Zellkerne, der cytoplasmatischen Grundsubstanz, der Mitochondrien und der Fettkörper beobachten.

Abweichend hiervon verläuft die Entwicklung der Volumendichte bei Lysosomen und glattem endoplasmatischen Retikulum. Hier ist periportal die maximale Zunahme der Werte bereits bis zur 14. Std. nach Operation erfolgt, während unter HU ein gewisser Rückgang zu erkennen ist. Die übrigen Zellparameter lassen sich keiner bestimmten Reaktionsweise zuordnen.

Insgesamt ist bei der überwiegenden Mehrzahl der Zellparameter bei Bezugnahme auf die Einzelzelle, welche trotz der gleichzeitigen Volumenzunahme der Restleber ein stabiles Bezugssystem darstellt, unter HU eine Zunahme der Werte zu verzeichnen. Zusammen mit dem parallelen Anstieg des Lebergewichtes und der Volumenvergrößerung der Einzelzelle werden diese Veränderungen als hypertrophische Reaktion der Leber gedeutet, die durch die partielle Hepatektomie ini-

tiert und unter HU fortgesetzt wird. Der Begriff des "unbalanced growth" ist auf diese hypertrophischen Veränderungen jedoch nur beschränkt anwendbar. Entsprechend dem zeitlich und räumlich gestaffelten Einsetzen der DNS-Synthese nach partieller Hepatektomie ist unter den vorliegenden Versuchsbedingungen die Hemmung der DNS-Synthese durch HU und damit die Voraussetzung für das Auftreten von "unbalanced growth" nur im periportalen Bereich zu erwarten. Ungeachtet der Lokalisation findet die Hypertrophie der Leber unter HU in morphologisch intakten Zellen statt. Die funktionelle Aktivität der Hepatozyten ist, wie am Beispiel des rauhen und glatten endoplasmatischen Retikulums gezeigt werden konnte, erhalten oder sogar deutlich gesteigert. Dies spricht für die funktionelle Vollwertigkeit der regenerierenden Rattenleber unter HU mit kompensatorischer Leistungssteigerung der Einzelzellen. Der besondere Wert des stereologisch-morphometrischen Vorgehens bei den vorliegenden Versuchen besteht in der Möglichkeit, den differenzierten Aufbau der Leber angemessen zu berücksichtigen und das Ausmaß der hypertrophischen Vorgänge den einzelnen Zellbestandteilen und Lobulusabschnitten exakt zuzuordnen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Regeneration der Rattenleber nach partieller Hepatektomie vollzieht sich bei ungestörtem Ablauf in einem Wechselspiel von Hypertrophie und Hyperplasie. Das Einsetzen der DNS-Synthese läuft intralobulär gestaffelt ab, beginnend mit den periportalten Zellen ca. zur 15. Std. nach partieller Hepatektomie, gefolgt von den intermediären Zellen nach 22 Stunden, während die DNS-Synthesephase der perivenösen Zellen jenseits der 30. Std. nach partieller Hepatektomie liegt. Bei den vorliegenden Experimenten wurde der Übergang der Hepatozyten in die Hyperplasie durch eine Dauerinfusion der teilhepatektomierten Tiere mit Hydroxyharnstoff, einem selektiven DNS-Synthese-Hemmer, verhindert. Biochemisch findet man während der Hydroxyharnstoffinfusion trotz fast vollständiger Hemmung der DNS-Synthese ein Fortlaufen der RNS- und Proteinsynthese. Dieser Zustand der Dissoziation der makromolekularen Synthesen, der auf ein Fortbestehen der hypertrophischen Komponente hindeutet, wird als "unbalanced growth" bezeichnet. In der Literatur fehlen bisher Angaben über die morphologischen Veränderungen der Leberzelle durch eine protrahierte DNS-Synthesehemmung mit Hydroxyharnstoff.

Es wurde eine morphometrisch-stereologische Untersuchung vorgenommen, mit getrennter Auswertung der periportalten (P) und perivenösen (V) Zellen, um den unterschiedlichen zeitlichen Ablauf der regenerativen Vorgänge im Leberlobulus zu erfassen. Untersucht wurden drei Versuchsgruppen zu je 4 Tieren, eine Kontrollgruppe unbehandelter Tiere (Kontr.), eine zweite Gruppe 14 Stunden nach partieller Hepatektomie (p.H.) und eine dritte Gruppe nach zusätzlicher Hydroxyharnstoffinfusion von der 14. bis zur 30. Std. nach partieller Hepatektomie (p.H.+HU). Die Versuchszeitpunkte wurden so gewählt, daß die Hemmung der DNS-Synthese im Periportalbereich über 15 Stunden wirksam wird, während die perivenösen Zellen sich in der 30. Std. nach partieller Hepatektomie bezüglich der DNS-Synthese in einem ähnlichen

funktionellen Zustand befinden wie die periportalen Zellen in der 14. Std. nach Operation.

Lichtmikroskopisch zeigt das Zellvolumen eines durchschnittlichen sog. "mononukleären Hepatozyten" im periportalen Bereich eine kontinuierliche Volumenzunahme von $6365 \mu\text{m}^3$ (Kontr.) über $8029 \mu\text{m}^3$ (p.H.) auf $10495 \mu\text{m}^3$ (p.H.+HU), während die perivenösen Zellen zunächst keine Volumenvergrößerung zeigen ($5572 \mu\text{m}^3$ (Kontr.) bzw. $5992 \mu\text{m}^3$ (p.H.)), im weiteren Verlauf jedoch auf ein Volumen von $8038 \mu\text{m}^3$ (p.H.+HU) ansteigen. Bei einem Ausgangswert von $310 \mu\text{m}^3$ (Kontr., P), zeigt die Zunahme des Kernvolumens einen ähnlichen zeitlichen Verlauf.

Elektronenmikroskopisch findet sich bei den Mitochondrien pro Einzelzelle eine Zunahme des Mitochondrienvolumens von $926 \mu\text{m}^3$ (P) bzw. $677 \mu\text{m}^3$ (V) (Kontr.) auf $1552 \mu\text{m}^3$ (P) bzw. $1021 \mu\text{m}^3$ (V) (p.H.+HU) mit einer entsprechenden Flächenzunahme der mitochondrialen Außenmembran, während die Flächenveränderungen der Cristae uneinheitlich sind. Morphologisch zeigen die Mitochondrien der Hydroxyharnstoffgruppe vermehrt eine schüssel- oder uhrglasförmige Gestalt. Eine im Leberläppchen gleichmäßige Zunahme ist bei Microbodies und Lysosomen nachzuweisen, während die Vermehrung des Fettanteils eine ausgeprägte Bevorzugung des periportal Bereichs aufweist. Das rauhe endoplasmatische Retikulum zeigt geringe morphologische Veränderungen wie Auftreibungen der Zisternen und teilweise Degranulierung der Membranen. Morphometrisch findet sich ein etwa 60%iger Anstieg von Volumen und Oberfläche in beiden Läppchenabschnitten bei Ausgangswerten von (Kontr.) $261 \mu\text{m}^3$ (P) bzw. $196 \mu\text{m}^3$ (V) für das Volumen und $15191 \mu\text{m}^2$ (P) bzw. $11958 \mu\text{m}^2$ (V) für die Oberfläche des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Die Zahl der Ribosomen pro Einzelhepatozyt läßt ebenfalls eine gewisse Zunahme erkennen. Eine deutliche Vergrößerung von Volumen und Oberfläche zeigt das glatte endoplasmatische Retikulum, wobei die Werte im perivenösen Bereich meist höher liegen (Volumen in μm^3 : Kontr.: 411 (P) bzw. 600 (V); p.H.: 957 (P) bzw. 892 (V);

p.H.+HU: 891 (P) bzw. 1153 (V); Oberfläche in μm^2 : Kontr.: 15989 (P) bzw. 23520 (V); p.H.: 37751 (P) bzw. 43884 (V); p.H.+HU: 45071 (P) bzw. 58726 (V)). Für die Volumendichte des glatten endoplasmatischen Retikulums ist periportal die maximale Zunahme bereits zur 14. Std. nach partieller Hepatektomie erreicht, wobei unter Hydroxyharnstoff ein leichter Rückgang zu beobachten ist.

Insgesamt findet sich nach partieller Hepatektomie und Gabe von Hydroxyharnstoff gegenüber der Kontrollgruppe eine unterschiedlich starke Vergrößerung bzw. Vermehrung aller Zellbestandteile, die teilweise in ihrem Ausmaß der Hemmung der DNS-Synthese parallel läuft. Diese Veränderungen werden als hypertrophische Reaktion der Leber gedeutet, die durch die partielle Hepatektomie initiiert und unter Hydroxyharnstoff fortgesetzt wird. Die funktionelle Aktivität der Hepatozyten ist hierbei, wie in vergleichenden Untersuchungen für das rauhe und glatte endoplasmatische Retikulum gezeigt wird, erhalten oder sogar gesteigert. Die Blockade der DNS-Synthese wird von den Hepatozyten offensichtlich ohne Schaden toleriert. Sie sind in der Lage, nach Aufhebung des Blocks innerhalb kürzester Zeit in die DNS-Synthese mit nachfolgender Mitose einzutreten.

7. TABELLARISCHER ANHANG

In den Tabellen I - XXIII sind die Mittelwerte und in Klammern die Standardfehler der 3 Versuchsgruppen getrennt nach periportal und perivenöser Lokalisation aufgeführt. Zur Bedeutung der Aufschlüsselung der statistischen Angaben nach "Behandlung", "Lokalisation" und "Wechselwirkung" siehe Kap. 3.12.2. mit dem Beispiel in Tab. 5, S. 61.

Abkürzungen:

Kontr. = Kontrollgruppe

p.H! = 14. Std. nach partieller Hepatektomie

p.H.+HU = Hydroxyharnstoff (HU) von der 14.-30. Std.
nach partieller Hepatektomie

P = periportal

V = perivenös

Tab. I: Volumendichte des Extrahepatozellulärtraumes (V_{VEX})

	pro cm ³ Lebergewebe cm ³ /cm ³	
	P	V
Kontrolle	0,152 (0,008)	0,187 (0,007)
p.H.	0,119 (0,012)	0,123 (0,016)
p.H.+HU	0,116 (0,012)	0,145 (0,011)

Statistik:

p <

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

1. 0,025

- a) 0,05
- b) -
- c) 0,10

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

2. 0,005

- a) 0,025
- b) -
- c) 0,10

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

3. - - -

- a)
- b)
- c)

Tab. II: Volumendichte der Hepatozyten (V_{VH})

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3		pro Einzelhepatozyt μm^3	
	P	V	P	V
Kontrolle	0,848 (0,008)	0,814 (0,007)	6365 (534)	5572 (382)
p.H.	0,881 (0,012)	0,877 (0,016)	8029 (448)	5992 (453)
p.H.+HU	0,884 (0,012)	0,855 (0,011)	10495 (733)	8038 (726)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lo $\bar{\text{ka}}$ lisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

p <

1. 0,025

- a) 0,05
- b) -
- c) 0,10

2. 0,005

- a) 0,025
- b) -
- c) 0,10

3. - - -

- a)
- b)
- c)

p <

1. 0,005

- a) -
- b) 0,025
- c) 0,005

2. 0,005

- a) 0,10
- b) 0,05
- c) -

3. - - -

- a)
- b)
- c)

Tab. III: Volumendichte des Hepatozytocytoplasmas (V_{VCYT})

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3	pro Einzelhepatozyt μm^3
	P	V
Kontrolle	0,806 (0,006)	0,771 (0,004)
		6055 (506)
		5279 (362)
p.H.	0,830 (0,011)	0,830 (0,015)
		7562 (426)
		5674 (415)
p.H.+HU	0,838 (0,011)	0,811 (0,009)
		9946 (690)
		7631 (711)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
b) p.H. - p.H.+HU
c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
b) p.H. P - V
c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
b) p.H. - p.H.+HU
c) Kontr. - p.H.+HU

p <

1. 0,025

- a) 0,05
b) -
c) 0,10

2. 0,005

- a) 0,025
b) -
c) -

3. 0,05

- a) -
b) -
c) -

p <

1. 0,005

- a) -
b) 0,025
c) 0,005

2. 0,005

- a) 0,10
b) 0,05
c) -

3. - - -

- a) -
b) -
c) -

Tab. IV: Volumendichte der Hepatozytenkerne (V_N)

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3	pro Einzelhepatozyt μm^3		
	P	V	P	V
Kontrolle	0,041 (0,004)	0,043 (0,004)	310 (36)	293 (32)
p.H.	0,051 (0,003)	0,047 (0,002)	466 (30)	318 (23)
p.H.+HU	0,046 (0,001)	0,044 (0,003)	549 (44)	407 (18)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. p - V
- b) p.H. p - V
- c) p.H.+HU p - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <
1. <u>Behandlung:</u>	1. <u>0,005</u>	1. <u>0,005</u>
a) Kontr. - p.H.	a) 0,10	a) 0,10
b) p.H. - p.H.+HU	b) 0,10	b) 0,10
c) Kontr. - p.H.+HU	c) 0,005	c) 0,005
2. <u>Lokalisation:</u>	2. <u>0,005</u>	2. <u>0,005</u>
a) Kontr. p - V	a) -	a) -
b) p.H. p - V	b) 0,025	b) 0,025
c) p.H.+HU p - V	c) 0,10	c) 0,10
3. <u>Wechselwirkung:</u>	3. <u>-</u>	3. <u>-</u>
a) Kontr. - p.H.	a) -	a) -
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) -	c) -

Tab. V: Numerische Dichte der Hepatozytenkerne (N_{VN})

	pro cm ³ Lebergewebe cm ⁰ /cm ³ x 10 ⁶	
	P	V
Kontrolle	136,4 (13,0)	148,0 (9,7)
p.H.	110,7 (6,8)	148,2 (8,4)
p.H.+HU	85,4 (6,6)	109,3 (10,8)

Statistik:

p <

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

1. 0,01 -
a) -
b) 0,05
c) 0,01

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

2. 0,005
a) -
b) 0,05
c) -

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

3. - - -
a)
b)
c)

Tab. VI: Plasma- Kern- Relation (V_{CYT}/V_{VN})

	cm^3/cm^3	
	P	V
Kontrolle	19,87 (1,64)	18,48 (1,62)
p.H.	16,31 (0,73)	17,91 (0,78)
p.H.+HU	18,17 (0,32)	18,64 (1,13)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p ~	
1.	-	-
	a)	
	b)	
	c)	
2.	-	-
	a)	
	b)	
	c)	
3.	-	-
	a)	
	b)	
	c)	

Tab. VII: Volumendichte der Mitochondrien (V_{VM})

	pro cm ³ Lebergewebe cm ³ /cm ³		pro cm ³ Cytoplasma cm ³ /cm ³		pro Einzelhepatozyt um ³	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	0,125 (0,012)	0,099 (0,002)	0,155 (0,014)	0,128 (0,001)	926 (68)	677 (105)
p.H.	0,142 (0,012)	0,119 (0,008)	0,171 (0,013)	0,143 (0,010)	1301 (151)	808 (68)
p.H.+HU	0,131 (0,004)	0,109 (0,003)	0,156 (0,004)	0,134 (0,005)	1552 (120)	1021 (92)

Statistik:	p <	p <	p <
1. <u>Behandlung:</u>	1. - - -	1. - - -	1. 0,005
a) Kontr. - p.H.	a)	a)	a)
b) p.H. - p.H.+HU	b)	b)	b)
c) Kontr. - p.H.+HU	c)	c)	c)
2. <u>Lokalisation:</u>	2. 0,001	2. 0,001	2. 0,001
a) Kontr. P - V	a)	a)	a)
b) p.H. P - V	b)	b)	b)
c) p.H.+HU P - V	c)	c)	c)
3. <u>Wechselwirkung:</u>	3. - - -	3. - - -	3. - - -
a) Kontr. - p.H.	a)	a)	a)
b) p.H. - p.H.+HU	b)	b)	b)
c) Kontr. - p.H.+HU	c)	c)	c)

Tab. VIII: Oberflächendichte der Mitochondrienaußenmembran (S_{VMO})

	pro cm^3 Lebergewebe m^2/cm^3		pro cm^3 Cytoplasma m^2/cm^3		pro Einzelhepatozyt μm^2	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	1,343 (0,177)	1,184 (0,115)	1,662 (0,213)	1,535 (0,143)	9900 (1170)	8102 (991)
p.H.	1,608 (0,087)	1,225 (0,126)	1,940 (0,119)	1,475 (0,143)	14563 (613)	8415 (1223)
p.H.+HU	1,315 (0,115)	1,336 (0,113)	1,574 (0,151)	1,645 (0,064)	15426 (1093)	12558 (1301)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <	p <
1.	- - - a) b) c)	- - - a) b) c)	1. 0,01 a) b) c) 0,01
2.	0,10 a) b) c)	- - - a) b) c)	2. 0,005 a) b) c) 0,05
3.	- - - a) b) c)	- - - a) b) c)	3. - - - a) b) c)

Tab. IX: Oberflächendichte der Mitochondrieninnenmembran (S_{VMC})

	pro cm ³ Lebergewebe m ² /cm ³		pro cm ³ Cytoplasma m ² /cm ³		pro Einzelhepatozyt μm ²	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	5,057 (0,688)	3,921 (0,432)	6,259 (0,828)	5,081 (0,538)	37265 (4535)	26886 (3817)
p.H.	4,766 (0,182)	2,936 (0,338)	5,752 (0,292)	3,529 (0,372)	43270 (2072)	20257 (3324)
p.H.+HU	3,607 (0,105)	3,683 (0,235)	4,303 (0,110)	4,549 (0,328)	42634 (2304)	34550 (3895)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

p <

1. - - -

- a)
- b)
- c)

p <

1. 0,10 -

- a)
- b)
- c)

p <

1. - - -

- a)
- b)
- c)

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

2. 0,01 -

- a)
- b)
- c)

2. 0,025

- a)
- b)
- c)

2. 0,001

- a)
- b)
- c)

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

3. 0,10 -

- a)
- b)
- c)

3. 0,05 -

- a)
- b)
- c)

3. 0,10 -

- a)
- b)
- c)

Tab. X: Durchschnittliche Schnittfläche eines Mitochondrions (A_{AM}/N_{AM})

μm^2

	P	V
Kontrolle	0,322 (0,030)	0,255 (0,013)
p.H.	0,413 (0,026)	0,285 (0,022)
p.H.+HU	0,412 (0,029)	0,283 (0,022)

Statistik:

p <

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

1. - - -
a)
b)
c)

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

2. 0,001
a)
b) 0,01
c) 0,025

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

3. - - -
a)
b)
c)

Tab. XI: Mitochondrienaußenfläche pro Mitochondrienvolumen (S_{VMO}/V_{VM})

	$\mu m^2 / \mu m^3 = m^2 / cm^3$	
Kontrolle	7,787 (0,168)	9,072 (0,225)
p.H.	7,959 (0,217)	9,918 (0,690)
p.H.+HU	7,531 (0,280)	9,891 (1,076)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

p <

1. - - -

- a)
- b)
- c)

2. 0,01

- a) 0,05
- b)
- c)

3. - - -

- a)
- b)
- c)

Tab. XII: Mitochondrieninnenfläche pro Mitochondrienvolumen (S_{VMC}/V_{VM})

	$\mu m^2/\mu m^3 = m^2/cm^3$	
	P	V
Kontrolle	29,267 (0,601)	29,886 (0,191)
p.H.	23,617 (0,413)	23,657 (1,441)
p.H.+HU	20,992 (1,497)	26,841 (1,268)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) Kontr. P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

p <

1. 0,001

- a) 0,005
- b) -
- c) 0,005

2. 0,025

- a) -
- b) -
- c) 0,10

3. 0,05

- a) -
- b) 0,10
- c) -

Tab. XIII: Volumendichte der Microbodies (V_{VMB})

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3		pro cm^3 Cytoplasma cm^3/cm^3		pro cm^3 Einzelhepatozyt μm^3	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	0,003 (0,001)	0,005 (0,001)	0,004 (0,001)	0,006 (0,001)	25 (7)	32 (12)
p.H.	0,008 (0,001)	0,009 (0,001)	0,010 (0,001)	0,011 (0,001)	72 (11)	61 (8)
p.H.+HU	0,008 (0,001)	0,012 (0,001)	0,010 (0,001)	0,015 (0,002)	99 (16)	112 (12)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <	p <
1. <u>Behandlung:</u>	1. 0,001	1. 0,001	1. 0,001
a) Kontr. - p.H.	a) 0,005	a) 0,005	a) 0,01
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) 0,01
c) Kontr. - p.H.+HU	c) 0,001	c) 0,001	c) 0,001
2. <u>Lokalisation:</u>	2. 0,025	2. 0,01	2. - - -
a) Kontr. P - V	a) -	a) 0,10	a) -
b) p.H. P - V	b) -	b) -	b) -
c) p.H.+HU P - V	c) -	c) -	c) -
3. <u>Wechselwirkung:</u>	3. - - -	3. - - -	3. - - -
a) Kontr. - p.H.	a) -	a) -	a) -
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) -	c) -	c) -

Tab.XIV: Numerische Dichte der Microbodies (N_{VMB})

	pro cm^3 Lebergewebe $cm^0/cm^3 \times 10^9$		pro cm^3 Cytoplasma $cm^0/cm^3 \times 10^9$		pro Einzelhepatozyt cm^0	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	23,0 (4,0)	32,2 (6,8)	28,4 (4,8)	41,7 (8,5)	167 (23)	223 (56)
p.H.	64,1 (8,9)	59,6 (5,8)	77,0 (10,3)	71,6 (5,9)	594 (104)	411 (108)
p.H.+HU	50,9 (3,9)	60,5 (3,2)	60,8 (4,4)	74,5 (3,2)	611 (79)	568 (58)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <	p <
1. <u>Behandlung:</u>	1. <u>0,005</u>	1. <u>0,005</u>	1. <u>0,005</u>
a) Kontr. - p.H.	a) 0,005	a) 0,005	a) 0,025
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) 0,025	c) 0,025	c) 0,005
2. <u>Lokalisation:</u>	2. <u>0,10</u>	2. <u>0,10</u>	2. - - -
a) Kontr. P - V	a) -	a) -	a) -
b) p.H. P - V	b) -	b) -	b) -
c) p.H.+HU P - V	c) -	c) -	c) -
3. <u>Wechselwirkung:</u>	3. - - -	3. - - -	3. - - -
a) Kontr. - p.H.	a) -	a) -	a) -
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) -	c) -	c) -

Tab. XV: Durchschnittsvolumen eines einzelnen Microbodies (V_{VMB}/N_{VMB})

	μm^3	
	P	V
Kontrolle	0,147 (0,005)	0,146 (0,009)
p.H.	0,126 (0,011)	0,152 (0,008)
p.H.+HU	0,161 (0,005)	0,198 (0,015)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

p <

1. 0,01 -

- a) -
- b) 0,01
- c) 0,05

2. 0,025

- a) -
- b) 0,05
- c) -

3. - - -

- a)
- b)
- c)

Tab. XVI: Volumendichte der Lysosomen (V_{VLY})

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3		pro cm^3 Cytoplasma cm^3/cm^3		pro Einzelhepatozyt μm^3	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	0,002 (0,001)	0,002 (0,001)	0,002 (0,001)	0,002 (0,001)	13 (3)	11 (2)
p.H.	0,004 (0,001)	0,003 (0,001)	0,005 (0,001)	0,004 (0,001)	34 (2)	22 (4)
p.H.+HU	0,003 (0,000)	0,003 (0,001)	0,003 (0,000)	0,004 (0,001)	32 (3)	29 (4)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <	p <
1. <u>Behandlung:</u>	1. 0,001	1. 0,001	1. 0,001
a) Kontr. - p.H.	a) 0,001	a) 0,001	a) 0,001
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) 0,01	c) 0,01	c) 0,001
2. <u>Lokalisation:</u>	2. - - -	2. - - -	2. 0,10 -
a) Kontr. P - V	a) -	a) -	a) -
b) p.H. P - V	b) -	b) -	b) -
c) p.H.+HU P - V	c) -	c) -	c) -
3. <u>Wechselwirkung:</u>	3. - - -	3. - - -	3. - - -
a) Kontr. - p.H.	a) -	a) -	a) -
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) -	c) -	c) -

Tab. XVII: Volumendichte des Fettes (V_{VF})

	pro cm ³ Lebergewebe cm ³ /cm ³		pro cm ³ Cytoplasma cm ³ /cm ³		pro Einzelhepatozyt /um ³	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	0,000 (0,000)	0,002 (0,001)	0,000 (0,000)	0,002 (0,002)	2 (1)	11 (8)
p.H.	0,025 (0,009)	0,008 (0,003)	0,030 (0,011)	0,010 (0,004)	221 (76)	60 (25)
p.H.+HU	0,101 (0,022)	0,031 (0,007)	0,120 (0,025)	0,039 (0,009)	1192 (250)	287 (68)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <	p <
1. <u>Behandlung:</u>	1. <u>0,001</u>	1. <u>0,001</u>	1. <u>0,001</u>
a) Kontr. - p.H.	a) 0,05	a) 0,05	a) -
b) p.H. - p.H.+HU	b) 0,01	b) 0,01	b) 0,005
c) Kontr. - p.H.+HU	c) 0,001	c) 0,001	c) 0,001
2. <u>Lokalisation:</u>	2. <u>0,001</u>	2. <u>0,001</u>	2. <u>0,005</u>
a) Kontr. P - V	a) -	a) -	a) -
b) p.H. P - V	b) 0,10	b) 0,10	b) 0,10
c) p.H.+HU P - V	c) 0,05	c) 0,05	c) 0,05
3. <u>Wechselwirkung:</u>	3. <u>0,005</u>	3. <u>0,005</u>	3. <u>0,005</u>
a) Kontr. - p.H.	a) -	a) -	a) -
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) 0,05
c) Kontr. - p.H.+HU	c) 0,005	c) 0,01	c) 0,025

Tab. XVIII: Volumendichte der cytoplasmatischen Grundsubstanz (V_{VGS})

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3	pro cm^3 Cytoplasma cm^3/cm^3	pro Einzelhepatozyt μm^3
	P	V	P
Kontrolle	0,519 (0,019)	0,503 (0,016)	3933 (449)
P.H.	0,447 (0,015)	0,507 (0,010)	4077 (275)
P.H.+HU	0,438 (0,018)	0,471 (0,022)	5212 (457)
			3443 (252)
			3461 (247)
			4481 (588)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

p <

1. 0,10

- a) -
- b) -
- c) 0,10

p <

1. 0,025

- a) 0,10
- b) -
- c) 0,025

p <

1. 0,10

- a) -
- b) -
- c) 0,10

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

2. 0,025

- a) -
- b) 0,025
- c) -

2. 0,005

- a) -
- b) 0,01
- c) 0,05

2. 0,05

- a) -
- b) 0,10
- c) -

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

3. 0,025

- a) 0,10
- b) -
- c) -

3. 0,10

- a) -
- b) -
- c) -

3. -

- a) -
- b) -
- c) -

Tab. XIX: Volumendichte des rauen endoplasmatischen Retikulums (V_{VER})

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3	pro cm^3 Cytoplasma cm^3/cm^3	pro Einzelhepatozyt μm^3
	P	V	P
	V	P	V
Kontrolle	0,035 (0,005)	0,028 (0,007)	0,036 (0,009)
			261 (36)
p.H.	0,034 (0,006)	0,039 (0,006)	0,047 (0,006)
			314 (66)
p.H.+HU	0,036 (0,004)	0,036 (0,004)	0,044 (0,005)
			426 (39)
			196 (58)
			274 (51)
			325 (12)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <	p <
1. - - -	1. - - -	1. - - -	1. - - -
a) b) c)	a) b) c)	a) b) c)	a) b) c)
2. - - -	2. - - -	2. - - -	2. - - -
a) b) c)	a) b) c)	a) b) c)	a) b) c)
3. - - -	3. - - -	3. - - -	3. - - -
a) b) c)	a) b) c)	a) b) c)	a) b) c)

Tab. XX: Oberflächendichte des rauen endoplasmatischen Retikulums (S_{VRER})

	pro cm ³ Lebergewebe m ² /cm ³		pro cm ³ Cytoplasma m ² /cm ³		pro Einzelhepatozyt μm ² /μm ²	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	2,018 (0,277)	1,673 (0,505)	2,499 (0,537)	2,160 (0,639)	15191 (2777)	11958 (4192)
p.H.	2,439 (0,416)	2,544 (0,418)	2,928 (0,483)	3,052 (0,465)	22635 (4451)	17655 (3806)
p.H.+HU	2,064 (0,425)	2,049 (0,211)	2,458 (0,504)	2,525 (0,253)	23976 (4211)	18975 (1624)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	P <	V	P <	V	P <	V
1.	-	-	1.	-	1.	-
a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)
c)	c)	c)	c)	c)	c)	c)
2.	-	-	2.	-	2.	0,10
a)	a)	a)	a)	a)	a)	-
b)	b)	b)	b)	b)	b)	-
c)	c)	c)	c)	c)	c)	-
3.	-	-	3.	-	3.	-
a)	a)	a)	a)	a)	a)	-
b)	b)	b)	b)	b)	b)	-
c)	c)	c)	c)	c)	c)	-

Tab. XXI: Volumendichte des glatten endoplasmatischen Retikulums (V_{SER})

	pro cm^3 Lebergewebe cm^3/cm^3	pro cm^3 Cytoplasma cm^3/cm^3	pro Einzelhepatozyt μm^3
	P	V	P
Kontrolle	0,056 (0,011)	0,088 (0,004)	0,069 (0,014)
		0,115 (0,005)	411 (75)
p.H.	0,105 (0,008)	0,132 (0,018)	0,127 (0,011)
		0,160 (0,022)	957 (99)
p.H.+HU	0,074 (0,011)	0,123 (0,011)	0,088 (0,013)
		0,151 (0,002)	891 (165)
			1153 (105)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <	p <
1. <u>Behandlung:</u>	1. <u>0,025</u>	1. <u>0,025</u>	1. <u>0,005</u>
a) Kontr. - p.H.	a) 0,025	a) 0,025	a) 0,025
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) -	c) -	c) 0,005
2. <u>Lokalisation:</u>	2. <u>0,001</u>	2. <u>0,001</u>	2. - - -
a) Kontr. P - V	a) 0,10	a) 0,10	a) - - -
b) p.H. P - V	b) -	b) -	b) - - -
c) p.H.+HU P - V	c) 0,025	c) 0,025	c) - - -
3. <u>Wechselwirkung:</u>	3. - - -	3. - - -	3. - - -
a) Kontr. - p.H.	a) -	a) -	a) - - -
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) - - -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) -	c) -	c) - - -

Tab. XXII: Oberflächendichte des glatten endoplasmatischen Retikulums (S_{VSE})

	pro cm^3 Lebergewebe m^2/cm^3		pro cm^3 Cytoplasma m^2/cm^3		pro Einzelhepatozyt μm^2	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	2,139 (0,503)	3,442 (0,187)	2,650 (0,618)	4,466 (0,246)	15989 (3814)	23520 (1732)
p.H.	4,151 (0,147)	6,533 (0,810)	5,007 (0,227)	7,900 (1,065)	37751 (2140)	43884 (3977)
p.H.+HU	3,709 (0,609)	6,134 (0,366)	4,412 (0,693)	7,566 (0,467)	45071 (9278)	58726 (8870)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <	p <	p <
1. <u>Behandlung:</u>	1. <u>0,005</u>	1. <u>0,005</u>	1. <u>0,001</u>
a) Kontr. - p.H.	a) 0,005	a) 0,005	a) 0,01
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) 0,01	c) 0,025	c) 0,001
2. <u>Lokalisation:</u>	2. <u>0,001</u>	2. <u>0,001</u>	2. - - -
a) Kontr. P - V	a) 0,05	a) 0,05	a) -
b) p.H. P - V	b) 0,10	b) 0,10	b) -
c) p.H.+HU P - V	c) 0,10	c) 0,10	c) -
3. <u>Wechselwirkung:</u>	3. - - -	3. - - -	3. - - -
a) Kontr. - p.H.	a) -	a) -	a) -
b) p.H. - p.H.+HU	b) -	b) -	b) -
c) Kontr. - p.H.+HU	c) -	c) -	c) -

Tab. XXIII: Numerische Dichte der Ribosomen (N_{VRIBO})

	pro cm^3 Lebergewebe $cm^0/cm^3 \times 10^{15}$		pro cm^3 Cytoplasma $cm^0/cm^3 \times 10^{15}$		pro Einzelhepatozyt $cm^0 \times 10^6$	
	P	V	P	V	P	V
Kontrolle	0,588 (0,085)	0,445 (0,071)	0,729 (0,105)	0,577 (0,090)	4,468 (0,905)	3,094 (0,611)
p.H.	0,541 (0,071)	0,595 (0,057)	0,654 (0,091)	0,715 (0,059)	4,953 (0,757)	4,108 (0,609)
p.H.+HU	0,519 (0,043)	0,484 (0,025)	0,619 (0,053)	0,597 (0,031)	6,150 (0,625)	4,530 (0,393)

Statistik:

1. Behandlung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

2. Lokalisation:

- a) Kontr. P - V
- b) p.H. P - V
- c) p.H.+HU P - V

3. Wechselwirkung:

- a) Kontr. - p.H.
- b) p.H. - p.H.+HU
- c) Kontr. - p.H.+HU

	p <		p <		p <	
1.	-	-	1.	-	1.	-
a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)
c)	c)	c)	c)	c)	c)	c)
2.	-	-	2.	-	2.	0,05
a)	a)	a)	a)	a)	a)	0,10
b)	b)	b)	b)	b)	b)	-
c)	c)	c)	c)	c)	c)	0,05
3.	-	-	3.	-	3.	-
a)	a)	a)	a)	a)	a)	-
b)	b)	b)	b)	b)	b)	-
c)	c)	c)	c)	c)	c)	-

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ABERCROMBIE, M.: Estimation of nuclear population from microtomic sections.
Anat. Rec. 94, 239-247, 1946
- ALTMANN, H.-W.: Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 15-51, 1966
- BACCHETTI, S., and WHITMORE, G.F.: The Action of Hydroxyurea on Mouse L-Cells.
Cell Tissue Kinet. 2, 193-211, 1969
- BACH, G.: Gründung einer internationalen Gesellschaft für Stereologie
Z. Wiss. Mikroskopie 65, 190-195, 1963
- BACH, G.: Kugelgrößenverteilung und Verteilung der Schnittkreise; ihre wechselseitigen Beziehungen und Verfahren zur Bestimmung der einen aus der anderen.
in: Quantitative Methods in Morphology.
E.R. Weibel and H. Elias (Hrsg.)
Berlin, Springer, 1967, S. 23-45
- BADE, E.G.: Beitrag über die Frühstadien der Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie und die Ursache des kompensatorischen Wachstums.
Virchows Arch. path. Anat. 337, 503-514, 1964
- BAUGNET-MAHIEU, L., GOUTIER, R., and BAES, C.: Differential Response of Mitochondrial and Nuclear DNA Synthesis to Hydroxyurea in Normal and Regenerating Rat Liver.
Biochem. Pharmacol. 20, 141-149, 1971
- BECKER, F.F. and LANE, B.P.: Regeneration of the Mammalian Liver. I. Auto-Phagocytosis during Dedifferentiation of the Liver Cell in Preparation for Cell Division.
Amer.J.Path. 47, 783-801, 1965
- BERGLUND, O. and SJÖBERG, B.-M.: Effect of Hydroxyurea on T4 Ribonucleotide Reductase.
J. Biol. Chem. 254, 253-254, 1979
- BERLINER, J.A.: Formation of Enlarged Mitochondria in a Liver Cell Line in Response to a Synthetic Glucocorticoid.
J. Cell Biol. 64, 711-716, 1975
- BHUYAN, B.K., FRASER, T.J., GRAY L.G., KUENTZEL, S.L. and NEIL, G.L.: Cell-Kill Kinetics of several S-Phase-specific Drugs.
Cancer Res. 33, 888-894, 1973

- BHUYAN, B.K. and FRASER, T.J.: Antagonism between DNA Synthesis Inhibitors and Protein Synthesis Inhibitors in Mammalian Cell Cultures.
Cancer Res. 34, 778-782, 1974
- ELOBEL, G. and POTTER, var. R.: Studies on Free and Membrane-bound Ribosomes in Rat Liver. I. Distribution as related to Total Cellular RNA.
J. Mol. Biol. 26, 279-292, 1967
- BLOUIN, A., BOLENDER, R.P., and WEIBEL, E.R.: Distribution of Organelles and Membranes between Hepatocytes and Nonhepatocytes in the Rat Liver Parenchyma. A Stereological Study.
J. Cell Biol. 72, 441-455, 1977
- BOLENDER, R.P., PAUMGARTNER, D., LOSA, G., MUELLENER, D. and WEIBEL, E.R.: Integrated Stereological and Biochemical Studies on Hepatocytic Membranes. I. Membrane Recoveries in Subcellular Fractions.
J. Cell Biol. 77, 565-583, 1978
- BOLENDER, R.P. and WEIBEL, E.R.: A Morphometric Study of the Removal of Phenobarbital-induced Membranes from Hepatocytes after Cessation of Treatment.
J. Cell Biol. 56, 746-761, 1973
- BOSMANN, H.B.: Macromolecular Synthesis in E. coli, Isolated Mitochondria and L5178Y Cells in the Presence of Hydroxyurea or Formamidoxime.
Chem.-Biol. Interactions 3, 429-437, 1971
- BRIESE, F. and CARPENTER, A.M.: Computer Analysis of Pancreatic Islet Tissue.
in: Proc. 2nd Int. Congr. Stereology
H. Elias (Hrsg.)
New York, Springer, 1967, S. 133-134
- BROWNLEE, K.A.: Statistical theory and methodology.
J. Wiley & Sons, New York, 1965
- BRUNI, C. and PORTER, K.R.: The fine structure of the parenchymal cell of the normal rat liver. I. General observations.
Am. J. Path. 46, 691-755, 1965
- BUCHER, N.L.R.: Regeneration of Mammalian Liver.
Int. Rev. Cytol. 15, 245-300, 1963
- BUCHER, N.L.R.: Experimental aspects of hepatic regeneration.
New Engl. J. Med. 277, 686-696, 738-746, 1967
- CAMERON, J.L., and JETER, J.R.: Action of Hydroxyurea and N-Carbamoyloxymurea on the Cell Cycle of Tetrahymena.
Cell Tissue Kinet. 6, 289-301, 1973

- CHALKLEY, H.W., CORNFIELD, J. and PARK, H.: A Method for Estimating Volume-Surface Ratios.
Science 110, 295-297, 1949
- CHERMANT, J.L.: Quantitative Analysis of Microstructures in Materials Science, Biology and Medicine.
Praktische Metallographie, Sonderband 8,
Dr. Riederer-Verlag GmbH, Stuttgart 1978
- COHEN, S.S. and BARNER, H.D.: Studies on Unbalanced Growth in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 40, 885-893, 1954
- COYLE, M.B. and STRAUSS, B.: Cell Killing and the Accumulation of Breaks in the DNA of HEp-2 Cells Incubated in the Presence of Hydroxyurea.
Cancer Res. 30, 2314-2319, 1970
- DAVID, H.: Submikroskopische Ortho- und Pathomorphologie der Leber.
Akademie-Verlag, Berlin, 1964
- DAVID, H.: Elektronenmikroskopische Organpathologie.
VEB Berlag Volk und Gesundheit, Berlin 1967
- DAVID, H.: Quantitative Ultrastructural Data of Animal and Human Cells.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1977
- DE HOFF, R.T. and RHINES, F.N.: Determination of the Number of Particles per Unit Volume from Measurements made on Random Plane Sections: the General Cylinder and the Ellipsoid.
Trans. Metal. Soc. AIME 221, 975-982, 1961
- DE HOFF, R.T. and RHINES, F.N. (Hrsg.): Quantitative Microscopy.
New York, McGraw-Hill, 1968
- DELESSE, A.: Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 25, 544-545, 1847. (Zit. nach Weibel, 1963b)
- : Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches.
Ann. Mines 13, 379-386, 1848 (Zit. nach Elias et al. 1971)
- EBBESSON, S.O.E. and TANG, D.B.: A Comparison of Sampling Procedures in Structured Cell Population.
in: Proc. 2nd Int. Congr. Stereology.
H. Elias (Hrsg.)
New York, Springer, 1967, S. 131-132
- ELIAS, H.: in: Information on the International Society for Stereology.
Proc. 4th Int. Congr. Stereology
Hrsg.: E.E. Underwood, R. de Wit, G.A. Moore
Washington 1976, S. V
Nat. Bureau of Standards Special Publication 431

- ELIAS, H., HENNIG, A., and SCHWARTZ, D.E.: Stereology: Applications to Biomedical Research. *Physiological Reviews* 51, 158-200, 1971
- EXNER, H.E.: Volume Fraction Analysis. in: *Proc. 4th Int. Congr. Stereology* Hrsg.: E.E. Underwood, R. de Wit, G.A. Moore Washington 1976, S. 446-448
Nat. Bureau of Standards Special Publication 431
- FABRIKANT, J.L.: The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J. Cell Biol.* 36, 551-565, 1968
- FAHIMI, D.H.: Perfusion and Immersion Fixation of Rat Liver with Glutaraldehyd. *Lab. Invest.* 16, 736-750, 1967
- FARBER, E. and BASERGA, R.: Differential Effects of Hydroxyurea on Survival of Proliferating Cells in Vivo. *Cancer Res.* 29, 136-139, 1969
- FAWCETT, D.W.: Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 15, 1475-1502, 1955
- FEINER, R.R., COWARD, J.E. and ROSENKRANZ, H.S.: Effect of Hydroxyurea on Staphylococcus epidermis and Micrococcus lysodeikticus: Thickening of the Cell Wall. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 3, 432-435, 1973
- FORSSMAN, W.G., SIEGRIST, G., ORCI, L., GIRARDIER, L., PISTET, R., ROUILLER, Ch.: Fixation par perfusion pour la microscopie électronique. *Essai de généralisation.* *J. Microscopie* 6, 279-304, 1967
- FREERE, R.H. and WEIBEL, E.R.: Stereologic techniques in microscopy. *J. Roy. Microscop. Soc.* 87, 25-34, 1967
- GANDER, R.H.: Morphometric Microscope with Automatic Sampling Stage in: *Proc. 2nd Int. Congr. Stereology* H. Elias (Hrsg.) New York, Springer, 1967, S. 289-290
- GIGER, H. und RIEDWYL, H.: Bestimmung der Größenverteilung von Kugeln aus Schnittkreisradien. *Biometr. Zschr.* 12, 156-163, 1970
- GLAGOLEFF, A.A.: On the Geometrical Methods of Quantitative Mineralogic Analysis of Rocks. *Tr. Inst. Econ. Min. (Moskau)* 59, 1933 (Zit. nach Weibel, 1963b)

- GRISHAM, J.W.: A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with Thymidine-H³.
Cancer Res. 22, 842-849, 1962
- HAMMAR, F.A.: Methode, die Menge der Rinde und des Marks des Thymus, sowie die Größe der Hassalschen Körperchen zahlenmäßig festzustellen.
Z. Angew. Anat. Konstitutionslehre 1, 311-396, 1914
(Zit. nach Elias, Hennig and Schwartz, 1971)
- HAUG, H.: Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt.
Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 118, 302-312, 1955
- HAUG, H.: Probleme und Methoden der Strukturzählung im Schnittpräparat.
in: Quantitative Methods in Morphology.
E.R. Weibel and H. Elias (Hrsg.)
Berlin, Springer, 1967, 58-78
- HENNIG, A.: Bestimmung der Oberfläche beliebig geformter Körper mit besonderer Anwendung auf Körperhaufen im mikroskopischen Bereich.
Mikroskopie 11, 1-20, 1956a
- HENNIG, A.: Diskussion der Fehler bei der Volumenbestimmung mikroskopisch kleiner kugelliger Körper oder Hohlräume aus den Schnittprojektionen.
Z. wiss. Mikrosk. 63, 67-71, 1956b
- HENNIG, A.: Fehler der Oberflächenbestimmung von Kernen bei endlicher Schnittdicke.
Mikroskopie 12, 7-12, 1957a
- HENNIG, A.: Das Problem der Kernmessung. Eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Meßtechnik.
Mikroskopie 12, 174-202, 1957b
- HENNIG, A.: Fehlerbetrachtung zur Volumenbestimmung aus der Integration ebener Schnitte.
in: Quantitative Methods in Morphology
E.R. Weibel and H. Elias (Hrsg.)
Berlin, Springer, 1967, S. 99-129
- HENNIG, A. and MEYER-ARENDT, J.R.: Microscopic Volume Determination and Probability.
Lab. Invest. 12, 460-464, 1963
- HESS, F.A., WEIBEL, E.R. and PREISIG, R.: Morphometry of Dog Liver: Normal Base-Line Data.
Virchow's Arch. Abt. B Zellpath. 12, 303-317, 1973
- HIGGINS, G.M. and ANDERSON, R.M.: Experimental pathology of the liver; Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.
Arch. Pathol. 12, 186-202, 1931

- HILL, R.B. and GORDON, J.A.: Effect of Hydroxyurea Analogues in Regenerating Rat Liver.
Exptl. Mol. Pathol. 9, 71-76, 1968
- HILLIARD, J.E.: Assessment of Sampling Errors in Stereological Analyses.
in: Proc. 4th Int. Congr. Stereology
Hrsg.: E.E. Underwood, R. de Wit, G.A. Moore
Washington 1976, S. 59-67
Nat. Bureau of Standards Special Publication 431
- HOLMES, A.H.: "Petrographic Methods and Calculations",
Murby, London, 1927
(Zit. nach Weibel and Bolender 1973)
- HÜBNER, G.: Die pathischen Reaktionen des Lebergewebes.
Eine elektronenmikroskopische Studie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1968
- JORDAN, S.W.: Electron Microscopy of Hepatic Regeneration.
Exp. Molecul. Path. 3, 183-200, 1964
- KELLER, H.J., FRIEDLI, H.P., GEHR, P., BACHOFEN, M. and WEIBEL, E.R.: The Effects of Optical Resolution on the Estimation of Stereological Parameters.
in: Proc. 4th Int. Congr. Stereology
Hrsg.: E.E. Underwood, R. de Wit, G.A. Moore
Washington 1976, S. 409-410
Nat. Bureau of Standards Special Publication 431
- KIM, J.H., GELBARD, A.S. and PEREZ, A.G.: Action of Hydroxyurea on the Nucleic Acid Metabolism and Viability of HeLa Cells.
Cancer Res. 27, 1301-1305, 1967
- KIM, J.H., PEREZ, A.G. and DJORDJEVIC, B.: Studies on Unbalanced Growth in Synchronized HeLa Cells.
Cancer Res. 28, 2443-2447, 1968
- KNIGHT, B.W., WEIBEL, E.R., and GOMEZ, D.M.: Effect of Size Distribution on a Principle of Counting on Sections Structures Contained in a Volume.
Proc. 1st Int. Congr. Stereology, Wien 1963, S. 18a/1-2
- KRAKOFF, J.H., BROWN, N.C. and REICHARD, P.: Inhibition of Ribonucleoside Diphosphate Reductase by Hydroxyurea.
Cancer Res. 28, 1559-1565, 1968
- LAIPIS, P.J. and LEVINE, A.J.: DNA Replication in SV 40-Infected Cells. IX. The Inhibition of a Gap-filling Step during Synthesis of SV 40 DNA.
Virology 56, 580-594, 1973
- LAMBERT, W.C. and STUDZINSKI, G.P.: Recovery from Prolonged Unbalanced Growth Induced in HeLa Cells by High Concentrations of Thymidine.
Cancer Res. 27, 2364-2369, 1967

- LANE, B.P. and BECKER, F.F.: Regeneration of the Mammalian Liver. V. Mitotic Division in Cytologically Differentiated Liver Cells.
Amer. J. Path. 50, 435-445, 1967
- LORENZ, R.J.: Statistische Probleme bei der Bestimmung relativer Volumenanteile mit dem Punktzählverfahren.
Mikroskopie 33, 148-157, 1977
- LOUD, A.V. (1967): Quantitative estimation of the loss of membrane images resulting from oblique sectioning of biological membranes.
in: Proceedings 25th Anniversary Meeting of Electron Microscopy Society of America, Hrsg.: C.J. Arceneaux, Claitor's Book Store, Baton Rouge, La. 144, S. 144-145
- LOUD, A.V.: A quantitative stereological description of the ultra-structure of normal rat liver parenchymal cells.
J. Cell Biol. 37, 27-46, 1968
- LUFT, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 409-414, 1961
- MAGNUSSON, G.: Hydroxyurea-Induced Accumulation of Short Fragments during Polyoma DNA Replication. I. Characterization of Fragments.
J. Virol. 12, 600-608, 1973
- MAJUMDAR, C., TSUKADA, K. and LIEBERMAN, I.: Liver Protein Synthesis after Partial Hepatectomy and Acute Stress.
J. Biol. Chem. 242, 700-704, 1967
- MALKINSON, F.D., GRIEM, M.L. and MARIANOVIC, R.: Effects of Hydroxyurea and Radiation in Hair Matrix Cells.
Cell Tissue Kinet. 6, 395-405, 1973
- MARKS, Ch., MARKEY, C., DYER, R. and VAUPEL, M.R.: An Electron Microscopic Study of the Effects of Portocaval Shunts on the Ultrastructure of the Rat Liver after Partial Hepatectomy.
Amer. J. Surg. 129, 156-162, 1975
- MARTIN, R.F., RADFORD, I., and PARDEE, M.: Accumulation of Short DNA Fragments in Hydroxyurea Treated Mouse L-Cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 9-15, 1977
- MAYHEW, T.M.: A comparison of several methods for stereological determination of the numbers of organelles per unit volume of cytoplasm.
J. Microscopy 96, 37-44, 1972
- MOORE, E.C.: The Effects of Ferrous Ion and Dithioerythritol on Inhibition by Hydroxyurea on Ribonucleotide Reductase.
Cancer Res. 29, 291-295, 1969

- NOVIKOFF, A.B.: Cell Heterogeneity within the Hepatic Lobule of the Rat. (Staining Reactions).
J. Histochem. Cytochem. 7, 240-244, 1959
- OCKEY, C.H. and ALLEN, T.D.: Distribution of DNA or DNA Synthesis in Mammalian Cells Following Inhibition with Hydroxyurea and 5-Fluorodeoxyuridine.
Exptl. Cell Res. 93, 275-282, 1975
- OEHLERT, W., HÄMMERLING, W. und BÜCHNER, F.: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonucleinsäure-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie.
Beitr. path. Anat. 126, 91-112, 1962
- PARKS, H.F.: Electron Microscopic Investigation of the Source and Direction of Movement of Lipid Granules Appearing in the Hepatic Perisinusoidal Space Following Partial Hepatectomy.
Amer. J. Anat. 124, 513-530, 1969
- PFEIFFER, S.E. and TOLMACH, L.J.: Inhibition of DNA Synthesis in HeLa Cells by Hydroxyurea.
Cancer Res. 27, 124-129, 1967
- PHILIPS, F.S., STERNBERG, S.S., SCHWARTZ, H.S., CRONIN, A.P., SODERGREN, J.E. and VIDAL, P.M.: Hydroxyurea. I. Acute Cell Death in Proliferating Tissues in Rats.
Cancer Res. 27, 61-74, 1967
- PILSTRÖM, L. and NORDLUND, U.: The Effect of Temperature and Concentration of the Fixative on Morphometry of Rat Liver Mitochondria and Rough Endoplasmic Reticulum.
J. Ultrastruct. Res. 50, 33-37, 1975
- RABES, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver.
in: Progress in Liver Diseases, Vol. 5, S. 83-99,
Hrsg.: H. Popper and F. Schaffner
Grune & Stratton, New York, 1976
- RABES, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver.
in: Hepatotrophic Factors
Ciba Foundation Symposium 55 (new series), S. 31-59
Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland, 1978
- RABES, H.M. and BRÄNDLE, H.: Synthesis of RNA, Protein, and DNA in the Liver of Normal and Hypophysectomized Rats after Partial Hepatectomy.
Cancer Res. 29, 817-822, 1969
- RABES, H.M., ISELER, G., CZICHOS, S., und TUCZEK, H.V.: Synchronisation of Hepatocellular DNA Synthesis in Regenerating Rat Liver by Continuous Infusion of Hydroxyurea.
Cancer Res. 37, 1105-1111, 1977

- RABES, H.M. und TUCZEK, H.V.: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6, 302-312, 1970
- RABES, H.M., WIRSCHING, R., TUCZEK, H.V. and ISELER, G.: Analysis of Cell Cycle Compartments of Hepatocytes after Partial Hepatectomy.
Cell Tissue Kinet. 9, 517-532, 1976
- RAJEWSKY, M.F., HÜLSER, D.F. und FABRICIUS, E.: Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen.
Z. Krebsforsch. 76, 266-292, 1971
- RAPPAPORT, A.M.: Acinar units and the pathophysiology of the liver.
in: The Liver, Morphology, Biochemistry, Physiology.
Vol. I. Hrsg.: Ch. Rouiller,
Academic Press, New York 1963, S. 265-328
- RAPPAPORT, A.M., BOROWY, A.J., LOUGHEED, W.M. and LOTTO, W.N.: Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit.
Anat. Rec. 119, 11-33, 1954
- REITH, A.: Probleme bei der Bestimmung von Oberflächen-dichten von Biomembranen.
Mikroskopie (Wien) 33, 80-87, 1977
- REITH, A., BARNARD, T. and ROHR, H.P.: Stereology of Cellular Reaction Patterns.
Critical Reviews in Toxicology 4, 219-269, 1976
- REITH, A., SCHÜLER, B. und VOGELL, W.: Quantitative und qualitative elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur des Leberläppchens normaler Ratten.
Z. Zellforschung 89, 225-240, 1968
- REMMER, H.: The Role of the Liver in Drug Metabolism.
Am. J. Med. 49, 617-629, 1970
- REYNOLDS, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 208-212, 1963
- RICHARDSON, K.C., JANETT, L., and FINKE, E.H.: Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy.
Stain. Technol. 35, 313-323, 1960
- ROHR, H.P., OBERHOLZER, M., BARTSCH, G., and KELLER, M.: Morphometry in Experimental Pathology: Methods, Baseline Data, and Applications.
Int. Rev. Exp. Pathol. 15, 233-325, 1976

- ROHR, H.P. and RIEDE, U.N.: Experimental Metabolic Disorders and the Subcellular Reaction Pattern.
Current Topics in Pathology 58, 1-48, 1973
- ROHR, H.P., STREBEL, J. und BIANCHI, L.: Ultrastrukturell-morphometrische Untersuchungen an der Rattenleberparenchymzelle in der Frühphase der Regeneration nach partieller Hepatektomie.
Beitr. Path. Bd. 141, 52-74, 1970
- ROSSIVAL, A.: Über geometrische Gesteinsanalysen. Ein einfacher Weg zur ziffermäßigen Feststellung des Quantitätsverhältnisses der Mineralbestandteile gemengter Gesteine.
Verh. Königlich-Kaiserliches Geologisches Reichsamt (Wien), S. 143-175, 1898
(Zit. nach Weibel, 1963b)
- ROSS, D.W.: Cell Volume Growth after Cell Cycle Block with Chemotherapeutic Agents.
Cell Tissue Kinet. 9, 379-387, 1976
- ROUILLER, Ch. and JEZEQUEL, A.M.: Electron microscopy of the liver.
in: The Liver. Morphology, Biochemistry, Physiology.
Hrsg.: Ch. Rouiller, Vol. I, S. 195-265
Academic Press, New York and London, 1963
- RUECKERT, R.R. and MUELLER, G.C.: Studies on Unbalanced Growth in Tissue Culture. I. Induction and Consequences of Thymidine Deficiency.
Cancer Res. 20, 1584-1591, 1960
- SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden. 3. Aufl.
Springer, Berlin, 1972
- SALTYKOV, S.A.: Zavodskaja Laboratorija 12, Nr. 9/10, S. 816, 1946
Zit. aus: Saltykov, S.A.: Stereometrische Metallographie, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1974
- SCHWARTZ, H.S., GAROFALO, M., STERNBERG, S.S. and PHILIPS, F.S.: Hydroxyurea: Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Regenerating Liver of Rats.
Cancer Res. 25, 1867-1870, 1965
- SELBMANN, H.K.: Statistische Auswertungsverfahren in der klinisch-therapeutischen Forschung.
in: Methoden der Klinischen Pharmakologie
Hrsg.: H.P. Kuemmerle
Urban und Schwarzenberg, München, 1978, S. 59-82
- SHANK, R.E., MORRISON, G., CHENG, C.H., KARL, J. and SCHWARTZ, R.: Cell Heterogeneity within the Hepatic Lobule (Quantitative Histochemistry).
J. Histochem. Cytochem. 7, 237-239, 1959

- SIMAR, L.J.: L'ultrastructure des ganglions lymphatiques au cours des réactions immunitaires.
Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur,
Université de Liège, Faculté de Médecine, Liège, 1973
- SINCLAIR, W.K.: Hydroxyurea: Differential Lethal Effects on Cultured Mammalian Cells during the Cell Cycle.
Science 150, 1729-1731, 1965
- SINCLAIR, W.K.: Hydroxyurea: Effects on Chinese Hamster Cells Grown in Culture.
Cancer Res. 27, 297-308, 1967
- SITTE, H.: Morphometrische Untersuchungen an Zellen.
in: Quantitative Methods in Morphology.
E.R. Weibel and H. Elias (Hrsg.)
Berlin, Springer, 1967, 167-198
- SMALL, J.V.: Measurements of Section Thickness.
in: Electron Microscopy, Vol. I, S. 609-610
Hrsg.: Daria Steve Bocciarelli, Roma 1968
Tipografia Poliglotta Vaticana
- SMITH, C.S. and GUTTMANN, L.: Measurement of Internal Boundaries in Three-dimensional Structures by Random Sectioning.
Trans. AIME 197, 81-87, 1953
in: J. of Metals, Vol. 5, 1953
- STÄUBLI, W., HESS, R. and WEIBEL, E.R.: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell.
II. Effects of Phenobarbital on Rat Hepatocytes
J. Cell Biol. 42, 92-112, 1969
- STÖCKER, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 50, 53-74, 1966
- TANIKAWA, K.: Ultrastructural aspects of the liver and its disorders.
Springer-Verlag, Berlin, 1968
- TOMKEIEFF, S.I.: Linear Intercepts, Areas and Volumes.
Nature 155, 24, 1945
- TROTTER, N.L.: A fine structure study of lipid in mouse liver after partial hepatectomy.
J. Cell Biol. 21, 233-244, 1964
- TROTTER, N.L.: Electron-opaque, lipid containing bodies in mouse liver at early intervals after partial hepatectomy and sham operation.
J. Cell Biol. 25, 41-52, 1965
- TROTTER, N.L.: A fine structure study of mouse liver after partial hepatectomy and fasting.
in: Electron Microscopy, Vol. II, 6th Int. Congr.
Electron Microscopy, Kyoto 1966, S. 627-628

- UNDERWOOD, E.E.: Particle Size Distribution.
in: Quantitative Microscopy
R.T. De Hoff and F.T. Rhines (Hrsg.)
New York, McGraw-Hill, 1968, S. 149-200
- UNDERWOOD, E.E.: Quantitative Stereology.
Reading, Mass.: Addison. Wesley, 1970
- UNDERWOOD, E.E., DE WITT, R. and MOORE, G.A. (Hrsg.):
Proc. 4th Int. Congr. Stereology
Washington 1976, Nat. Bureau of Standards Special
Publication 431
- VESCO, C. and PENMAN, S.: Purified cytoplasmic DNA from
HeLa Cells: Resistance to Inhibition by Hydroxyurea.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 249-257, 1969
- WATSON, M.L.: The nuclear envelope; its structure and
relation to cytoplasmic membranes.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 257-270, 1955
- WEIBEL, E.R.: Principles and Methods for the Morphometric
Study of the Lung and Other Organs.
Lab. Invest. 12, 131-151, 1963a
- WEIBEL, E.R.: Morphometry of the Human Lung.
Springer, Berlin, 1963b
- WEIBEL, E.R.: Stereological Principles for Morphometry in
Electron Microscopic Cytology.
Int. Rev. Cytol. 26, 235-302, 1969
- WEIBEL, E.R.: Selection of the Best Method in Stereology.
J. Microscopy 100, 261-269, 1974
- WEIBEL, E.R. and BOLENDER, R.P.: Stereological Techniques
for Electron Microscopic Morphometry.
in: Principles and Techniques of Electron Microscopy
Biological Applications, Vol. 3, 237-296
Hrsg.: M.A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company,
New York 1973
- WEIBEL, E.R. and ELIAS, H. (Hrsg.): Quantitative Methods
in Morphology.
Berlin, Springer 1967a
- WEIBEL, E.R. and ELIAS, H.: Introduction to Stereology
and Morphometry.
in: Quantitative Methods in Morphology.
E.R. Weibel and H. Elias (Hrsg.)
Berlin, Springer 1967b, S. 3-19
- WEIBEL, E.R. and ELIAS, H.: Introduction to Stereological
Principles.
in: Quantitative Methods in Morphology.
E.R. Weibel and H. Elias (Hrsg.)
Berlin, Springer 1967c, S. 89-98

- WEIBEL, E.R. and GOMEZ, D.M.: A Principle for Counting Tissue Structures on Random Sections.
J. Appl. Physiol. 17, 343-348, 1962
- WEIBEL, E.R., KISTLER, G.S. and SCHERLE, W.F.: Practical Stereological Methods for Morphometric Cytology.
J. Cell Biol. 30, 23-38, 1966
- WEIBEL, E.R. and PAUMGARTNER, D.: Integrated stereological and biochemical studies on hepatocytic membranes.
II. Correction of Section Thickness Effect on Volume and Surface Density Estimates.
J. Cell Biol. 77, 584-597, 1978
- WEIBEL, E.R., STÄUBLI, W., GNÄGL, H.R. and HESS, F.A.: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell.
I. Morphometric Model, Stereologic Methods, and Normal Morphometric Data for Rat Liver.
J. Cell Biol. 42, 68-91, 1969
- WHEATLEY, D.N.: Binucleation in mammalian liver.
Exptl. Cell Res. 74, 455-465, 1972
- WIBO, M., AMAR-COSTESECC, A., BERTHET, J. and BEAUFAY, H.: Electron Microscope Examination of Subcellular Fractions.
III. Quantitative Analysis of the Microsomal Fraction Isolated from Rat Liver.
J. Cell Biol. 51, 52-71, 1971
- WIBO, M., AMAR-COSTESECC, A., BERTHET, J. and BEAUFAY, H.: Morphometric Analysis of Rat Liver Microsomes.
in: The Liver. Quantitative Aspects of Structure and Function. Hrsg.: P. Paumgartner and R. Preisig, Karger, Basel 1973, S. 21-31
- WIENER, J., LOUD, A.V., KIMBERG, D.V. and SPIRO, D.: A quantitative description of cortisone-induced alterations in the ultrastructure of rat liver parenchymal cells.
J. Cell Biol. 37, 47-62, 1968
- WINNACKER, E.: Adenovirus Type 2 DNA-Replication. I. Evidence for Discontinuous DNA-Synthesis.
J. Virol. 15, 744-758, 1975
- YARBRO, J.W., NIEHAUS, W.G. and BARNUM, C.P.: Effect of Hydroxyurea on Regenerating Rat Liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 592-597, 1965
- YOUNG, C.W. and HODAS, S.: Hydroxyurea: Inhibitory Effect on DNA Metabolism.
Science 146, 1172-1174, 1964
- ZOTTER, St., KEMMER, Ch. und SAUER, L.: Zur Ultrastruktur der Leberparenchymzelle verschiedener Läppchenregionen bei neugeborenen Mäusen. 2. Morphometrische Untersuchungen.
Z. Mikrosk. Anat. Forschung (Leipzig) 84, 470-484, 1971

LEBENS LAUF

20. Sept. 1951 geboren in Walpertskirchen, Landkreis Erding, als zweites Kind des Versicherungsangestellten Rudolf Schmidkonz und seiner Ehefrau Pauline.
- 1957 - 1970 Volksschul- und Gymnasialbesuch in München.
- Juni 1970 Abitur am Wittelsbachergymnasium in München.
- Oktober 1970
- April 1972 Ziviler Ersatzdienst als Hilfspfleger in der Urologischen Universitätsklinik, München.
- Mai 1972 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität, München.
- April 1974 Physikum
- Oktober 1977
- September 1978 Auslandsstudium an der King's College Hospital Medical School, London, Großbritannien, als Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes.
- Oktober 1978
- September 1979 Praktisches Jahr im Westkrankenhaus, Augsburg (Innere Medizin), Krankenhaus München-Schwabing (Chirurgie) und in der Orthopädischen Poliklinik, München (Orthopädie).
- Oktober 1979 3. Teil der ärztlichen Prüfung.

